Série A n° 3877
N° d'ordre :
4728

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE GRADE DE
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Siba Jyoti GUHA

1re THÈSE : "ETUDES HISTOCHIMIQUES A PROPOS DE LA PHOSPHORYLASE ET DE "BRANCHING ENZYME".

2me THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 MAI 1962 *devant la Commission d'Examen.*

M. PRENANT — Président
Mme CHAIX — Examinateurs
M. BEAUMONT — Examinateurs

1962

Série A n° 3877
N° d'ordre :
4728

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR
LE GRADE DE
DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Siba Jyoti GUHA

1re THÈSE : "ETUDES HISTOCHIMIQUES A PROPOS DE LA PHOSPHORYLASE ET DE "BRANCHING ENZYME".

2me THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *devant la Commission d'Examen.*

M. PRENANT — Président
Mme CHAIX, M. BEAUMONT — Examinateurs

1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTE des SCIENCES de L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen ..... M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSE	T	Chimie organique
PREVOST	T	Evolution des êtres organisés
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie S.P.C.N. et sédimentaire
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.)
LUCAS R.	T	Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
BRELOT	T	Calcul différentiel et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Applications de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie Algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Technique mathématique de la Physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
RIZET	T	Génétique (Orsay)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides
LEDERER	T	Chimie biologique
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
COTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER		Physiologie comparée
CAMUS		Physiologie végétale (B.M.P.V.)
CASTAING	T	Physique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay)
NOIROT		Evolutions des êtes organisés
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay)
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biologie végétale (S.P.C.N.) (Orsay)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
Mlle JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.)
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay)
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie Physique
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (Orsay)
BRICART	T	Météorologie et physique de l'atmosphère
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie
FRIEDEL		Physique des solides (Orsay)
M. JULIA		Etudes des moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay)
MAGAT		Physico-chimie des radio-éléments
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiologie végétale (B.M.P.V.) (Orsay)
GUERIN	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay)
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.)
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.) (Orsay)
MICHEL L.		Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
BERGERARD		Zoologie (Orsay)
BERTEIN		Electronique (Orsay)
BOUISSIERES		Chimie des radioéléments (Orsay)
Mme COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique
ELLENBERGER		Géologie appliquée sur le terr.

FRANC		Biologie animale (P.C.B.)
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)
STOLKOWSKI		Physiologie générale
ACHER		Chimie biologique (Orsay)
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.)
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.)
BLAMONT		Géophysique ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (M.G.P.)
DURAND-DELGA		Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER		Physiologie végétale
TORTRAT		Calcul des probabilités
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
M^lle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.)
M^me CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste

M^lle VEIL		Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires
BROCHARD	T	Physique (P.C.B.) (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématiques (M.P.C.) (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie physique et Géologique dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides
CORABŒUF		Physiologie animale
DELLOUE		Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale (P.C.B.)
JULLIEN J.		Chimie (P.C.B.)
MALGRANGE		Technologie mathéamtique de la Physique
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE		Physique (E.N.S.) (Orsay)

Secrétaire général ..... R. POULLAIN

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean Verne

Professeur titulaire de la Chaire d'Histologie de la Faculté de Médecine de Paris

qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et guider mes premiers pas en histoenzymologie. Il a été pour moi le maître le plus bienveillant et le plus attentif, plein d'une profonde compréhension pour la difficulté de mes problèmes. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon très profond respect.

A Monsieur le Professeur Marcel Prenant

Professeur titulaire de la Chaire d'Histologie et d'Anatomie Comparée de la Faculté des Sciences de Paris

qui a bien voulu présider cette thèse et suivre les progrès de ce travail avec un intérêt toujours renouvelé. La très vive sympathie qu'il ma toujours témoignée, associée à des conseils très précieux m'ont été constamment d'un grand secours. Qu'il accepte ici ma très vive reconnaissance et l'expression de mon profond dévouement.

A Madame le Professeur Chaix

qui a bien voulu accepter d'être l'un des membres du Jury.
Ses précieux conseils m'ont permis d'éviter certaines erreurs.
Qu'elle trouve ici l'expression de mon très profond respect.

A Monsieur le Professeur Agrégé Beaumont

qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Agrégé Raymond Wegmann

qui m'a inspiré le sujet de cette thèse. J'ai cherché en lui un maître, c'est un ami que j'ai trouvé. Il n'a ménagé aucun sacrifice pour mettre tous les moyens nécessaires à ma disposition.
Qu'il accepte ici l'expression de ma reconnaissance émue et sincère.

A Madame Hébert

Chargée de Recherches à l'I. N. H.

dont l'intérêt toujours renouvelé dans mon travail m'a été d'un grand secours.
En témoignage de sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier également les membres de l'Institut d'Histochimie Médicale et plus particulièrement Mademoiselle Benedetti sans l'aide desquels la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible.

TABLE DES MATIERES

Première Partie

RAPPELS BICCHIMIQUES

		Page
Chapitre Premier - Introduction et historique		1
Chapitre II - Structure de glycogène		5
Chapitre III -	A. Phosphorylase d'origine animale	9
	B. Phosphorylase d'origine végétale	9
	C. Phosphorylase des bactéries	10
Chapitre IV -	A. Les acides aminés de la phosphorylase.....	11
	B. Co-enzyme ou le groupe prosthétique de phosphorylase	13
	C. Les centres phosphorylés dans la molécule de la phosphorylase	17
Chapitre V - Quelques propriétés des phosphorylases-kinases ..		20
Chapitre VI -	A. Effet des énzymes sur la phosphorylase	22
	B. Inhibiteurs de la phosphorylase	24
	C. Activateurs de la phosphorylase	29
Chapitre VII -	A. Effet des hormones sur la phosphorylase	31
	B. La phosphorylase et la glycogénèse.....	37
Chapitre VIII -	A. Phosphorylase d'organes particuliers	39
	B. Spécificité de la phosphorylase selon un organe déterminé	46
Chapitre IX -	Les enzymes de la synthèse et de la dégradation du glycogène	48
	A. Branching enzyme ou enzyme branchante	48
	B. Amylo 1,6 glucosidase	50
Chapitre X - La glycogénose et la phosphorylase		51
Chapitre XI - Phosphorylase dans les conditions expérimentales .		53

Deuxième Partie

ETUDES HISTOCHIMIQUES

Page

Chapitre Premier - Etudes histochimiques antérieures 57

Chapitre II - Recherches personnelles 62

Chapitre III - Les principes de la mise en évidence histochimique de la phosphorylase 64

Chapitre IV - A. Mise en évidence de la phosphorylase totale 67
B. Mise en évidence de la phosphorylase active préexistante 69
C. Préparation de tissus 70

Chapitre V - Etudes expérimentales sur la technique 71

Chapitre VI - Effet des fixateurs sur la conservation de l'activité phosphorylasique 78

Chapitre VII - Etudes histochimiques sur "branching enzyme" 84

Chapitre VIII - A. Distribution de la phosphorylase dans les organes 87
B. Culture de tissus 101
C. L'activité phosphorylasique chez les rats nouveaux-nés 102
D. L'activité phosphorylasique chez les embryons .. 103

Chapitre IX - Effet des activateurs et des inhibiteurs de la phosphorylase 106
A. Effet de l'acide adénosine-5-monophosphorique 106
B. Effet du cyclo-3',5'-AMP 107
C. Activation in vitro par la protamine 108
D. L'effet de l'héparine 112
E. L'effet de l'insuline 113
F. Effet des agents réducteurs 114
G. Effet du parachloromercuribenzoate (PCMB)..... 116
H. Effet du glucose 117
I. Effet de la phlorizine 118
J. Inhibition par le monoiodoacétate 118
K. Effet de l'éthylènediamine tétra acétate 120

Chapitre X - L'activité phosphorylasique chez les rats soumis à l'anoxie 121

Chapitre XI - Effet des vibrations infrasonores 123

Chapitre XII - Effet in vivo du glucagon 125

Chapitre XIII - Interprétation générale et appréciation critique des techniques antérieures 129

Conclusion 140

Bibliographie 143

Première partie

RAPPELS BIOCHIMIQUES

Chapitre Premier

INTRODUCTION et HISTORIQUE

Le processus de la dégradation et de la synthèse du glycogène était mal connu jusqu'en 1930, mais on savait déjà que l'apparition du glucose dans le sang est accompagnée de la disparition du glycogène dans le foie. On savait également que la production de l'acide lactique dans le muscle a un rapport avec la dégradation du glycogène musculaire (Cori C.F. 1931).

Jusqu'en 1936, on attribuait aux amylases le rôle d'enzymes de dégradation et de synthèse du glycogène. Mais le fait que les produits de dégradation provoqués par les amylases étaient limités à la dextrine et au maltose, le glucose n'apparaissant en quantité considérable qu'après une longue incubation, a fait soupçonner l'existence d'un autre système enzymatique. De plus, la synthèse du glycogène par les amylases, dans les conditions physiologiques n'a jamais pu être prouvée (Cori G.T. 1940).

Vers 1928, quelques auteurs, notamment Eggleton et Eggleton, Davenport et Sacks, et Lohman, ont observé, au cours de la stimulation du muscle (Cori 1940), la formation d'un ester de phosphate, difficilement hydrolysable (plus tard identifié comme le glucose-6-phosphate).

Parnas et Cstern (1936) ont démontré que le glycogène, dans le muscle, est dégradé en fructose diphosphate en présence d'acide adénosine triphosphate.

Plus tard, Cstern et ses collaborateurs ont démontré que ce processus de transformation peut être subdivisé dans les deux étapes suivantes :

a) glycogène + H_3PO_4 ⟶ Hexose monophosphate

b) Hexose monophosphate + ATP + H_2O ⟶ fructose diphosphate + H_3PO_4 + AMP

Le phénomène de la transformation du glycogène avec du phosphate libre, en ester hexose monophosphate a été appelé "phosphorolyse" par Parnas (Hassid, Doudoroff, Barker 1951).

En 1936, Cori et Cori ont découvert que la première étape de la "phosphorylation" consiste essentiellement dans la formation du glucose-1-phosphate. Ils ont pu isoler cet ester à partir du muscle. Cet ester est bien différent de l'ester obtenu par Eggleton et par d'autres auteurs puisqu'il est facilement hydrolysable par l'acide. Ces auteurs étaient les premiers à démontrer qu'une enzyme est responsable de cette réaction. Cette enzyme a été nommée phosphorylase par ces auteurs.

Bientôt, la phosphorylase a été trouvée dans le myocarde, dans le cerveau et dans le foie, par Cori, Colwick et Cori (1938). Elle a été décelée dans la levure par Cori et ses collaborateurs, par Schäffner et Specht (1938) et par Kiessling (1939). Hanes a prouvé son existence dans des tissus végétaux (1940 a et b).

Schäffner et Specht (1938) ont remarqué que la phosphorylase de la levure, en présence du glucose-1-phosphate, est capable de synthétiser le polysaccharide. La réversibilité de cette réaction (vers la synthèse du glycogène) dans le muscle, a été observée par Cori, Cori et Schmidt (1939), dans le foie par Cori, Schmidt et Cori (1939), et dans la levure par Kiessling (1939). La phosphorylase de la pomme de terre est aussi capable de synthétiser le polysaccharide (Hanes (1940 b).

La réaction de la phosphorylase selon Cori et ses collaborateurs peut être représentée comme la suivante :

$$\text{Polysaccharide + phosphate libre} \rightleftharpoons \text{Glucose-1-phosphate}$$

Cori et Cori (1936) ont remarqué que pour cette réaction la présence de l'acide adénylique et le glycogène est nécessaire (Cori C.T. et Cori C.F. 1939).

L'EQUILIBRE DE L'ACTION PHOSPHORYLASIQUE

La réaction de la phosphorylase peut être écrite conformément à la loi d'action de masse :

$$\frac{[(C_6 H_{10} O_5)n]\ [\text{Glucose-1-phosphate}]}{[(C_6 H_{10} O_5)n+1]\ [\text{phosphate}]} = K$$

La proportion de $(C_6 H_{10} O_5)n$ par rapport à $(C_6 H_{10} O_5)n+1$ dans la réaction est constante lorsque la phosphorylase réagit toute seule. Il paraît que la réaction est indépendante de la concentration du polysaccharide (Cori et Cori 1940). La proportion du glucose-1-phosphate et du phosphate libre est déterminée par la constante d'équilibre, K.

Les expériences de Cori et Cori et Green (1943) ont démontré que la proportion du glucose-1-phosphate et du phosphate inorganique dépend du pH. Pour la phosphorylase cristallisée du muscle, elle est 0,408 à pH 7,33 ;

0,322 au pH 6,96, et 0,47 au pH 6,07 (exemple : à pH 6,96, 15,6 pour cent du phosphate inorganique est en équilibre avec 24,4% de glucose-1-phosphate).

On classe essentiellement les enzymes en hydrolases et en transférases (Baldwin).

Les hydrolases scindent le substrat par l'action d'une molécule d'eau. La réaction, en général, pour l'hydrolyse s'écrit selon l'équation suivante :

$$R - O - A + H_2O \rightleftharpoons R - OH - AOH$$

Dans les réactions accomplies par des enzymes de transfert, le mécanisme consiste en un transfert d'un radical d'une molécule à une autre selon l'équation suivante :

$$R - C - A + R' - OH \rightleftharpoons R - OR' + AOH$$

La réaction peut être réversible si le changement d'énergie d'activation est négligeable. Selon cette classification, la phosphorylase est une transférase. Pour la phosphorylase, les radicaux R, R' représentent les unités glucosidiques.

Le terme "transglucosidase" a été proposé par Doudoroff, Barker et Hassid (1951) pour les enzymes responsables du transfert des unités glucosidiques.

Dans ce sens, la phosphorylase est aussi une transglucosidase.

Le rôle de Primer

Les auteurs qui ont étudié la réaction de la phosphorylase vers la synthèse du polysaccharide ont remarqué qu'avec la phosphorylase purifiée, la vitesse de la synthèse est extrêmementralentie au début de la réaction (Lag period).

Pour cette raison, Kiessling (1939) a émis une hypothèse en faveur de la non réversibilité de l'action phosphorylasique. Selon cet auteur, la synthèse du polysaccharide par la phosphorylase étant extrêmement lente, un autre système enzymatique doit réagir pour la synthèse du polysaccharide. Mais Cori et Cori (1940) et Hanes (1940 b) ont démontré que cette période ralentie est complètement supprimée lorsqu'une quantité du polysaccharide est ajoutée au milieu d'incubation. La synthèse du polysaccharide est alors achevée sans encombre. Le processus de synthèse a été appelé "condensation déphosphorolytique" par Hanes (1940 b) et le polysaccharide ajouté dans le milieu d'incubation qui a servi comme inducteur de la synthèse a été appelé le "primer".

Selon Cori et Cori (1940) la synthèse du polysaccharide est autocatalytique. En effet, la synthèse s'effectue en ajoutant successivement les molécules du glucose aux chaines amylosiques du polysaccharide qui sert comme primer, à partir du glucose-1-phosphate.

La vitesse initiale de la réaction a un rapport direct avec la concentration du glycogène ajouté. Plus la concentration du glycogène ajouté s'accroît, plus la synthèse du polysaccharide s'accélère. Pour la phosphorylase du muscle, selon Swanson et Cori (1948), le glycogène est le primer le plus efficace; l'amylopectine a une efficacité moyenne; l'amylose est encore moins satisfaisant. Mais la phosphorylase de différentes origines réagit de façon différente à l'égard du primer. Pour la phosphorylase de la pomme de terre, l'amylopectine est le primer le plus effectif (Swanson et Cori 1948).

Plus tard, il a été remarqué que la phosphorylase ultra-purifiée est totalement incapable de synthétiser la polysaccharide en l'absence d'un agent "primer" (Cohn et Cori 1950).

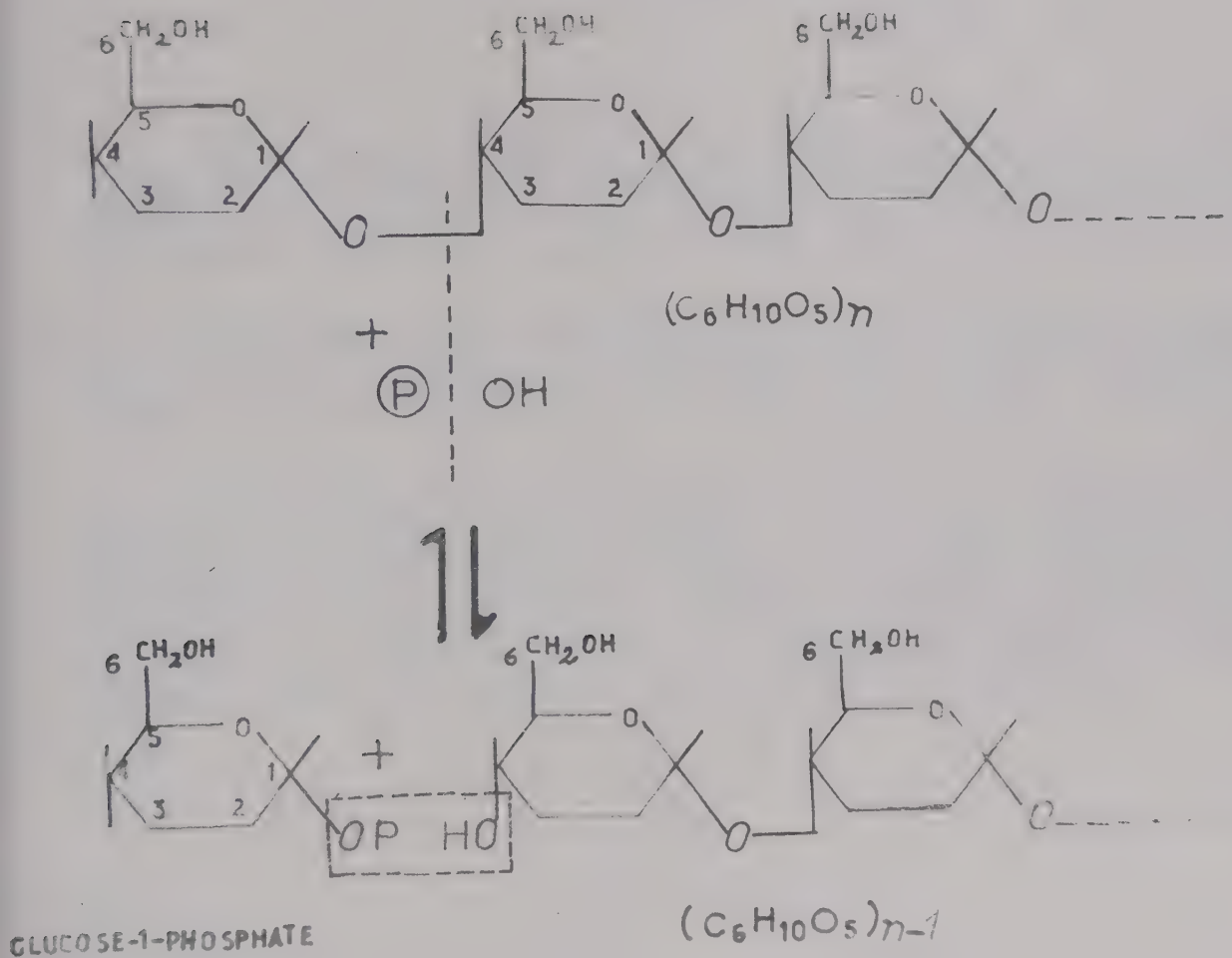
La réaction donc peut être représentée de la façon suivante :

$$(C_5 H_{10} O_5)_n + C_6 H_{11} O_5 - PO_3H \rightleftharpoons (C_6 H_{10} O_5)_{n+1} + PO_4H$$

polysaccharide primer — Glucose-1-phosphate

Seuls les polysaccharides ayant une liaison glucosidique α 1,4 sont capables de réagir comme le catalysateur de la réaction. Les polysaccharides ayant les liaisons tels que β 1,4 ou α 1,6 ne sont pas allongés sous l'influence de la phosphorylase (Hestrin 1949). Cependant, Swanson et Cori (1948) ont remarqué que la Dextrane de la bactérie Leuconostoc mesenteroïdes qui ne contient que des liaisons α-1,6 est capable de jouer le rôle de l'inducteur de la phosphorylase tant du muscle que de la pomme de terre. Par contre, Prohel et Day (1946) ont signalé que la dextrane active la phosphorylase de la pomme de terre seulement dans la proportion de 30% par rapport à l'amidon soluble.

Récemment Brown, Illingworth et Cori (1961) et Illingworth, Brown et Cori (1961) ont remarqué que la phosphorylase a ultra-purifiée de muscle est capable de synthétiser le polysaccharide même en absence de "Primer". Cette synthèse est précédée par une "lag-period" prolongée. Ces auteurs envisagent la possibilité de la synthèse de novo de glycogène par la phosphorylase dans les tissus d'embryons.



L'ACTION DE LA PHOSPHORYLASE

FIGURE 1

Chapitre II

STRUCTURE DE GLYCOGENE

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la phosphorylase, il nous paraît indispensable de résumer nos connaissances actuelles sur la structure de glycogène et le rôle spécifique joué par la phosphorylase dans sa synthèse et dans sa dégradation.

Le glycogène est un homopolysaccharide dont le poids moléculaire atteint plusieurs millions. Le hexose unique qui constitue sa molécule est le glucose. Les unités glucosidiques sont liées entre elles par des enchaînements.

Avant d'examiner les liaisons glucosidiques, il est necessaire de se rappeler la formule chimique du glucose. La formule attribuée autrefois au glucose était linéaire. Mais les anomalies rencontrées par cette formule linéaire lui ont fait substituer par Tollens une formule cyclique qui correspond mieux à l'ensemble de ses propriétés. Dans la formule cyclique les carbones 1 et 5 sont unis par un pont d'oxygène et le carbone 6 ne fait pas partie du cycle et se branche en dérivation sur le carbone 5.

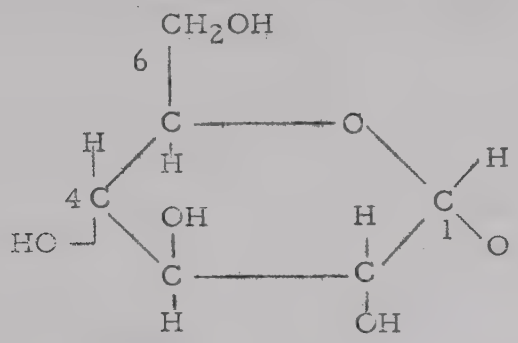


Fig. 2.- Glucose.

Haworth et ses collaborateurs (1937) sont les premiers à trouver que le glycogène possede une structure ramifiée. On sait que le glycogène soumis à la digestion de la β amylase fournit une certaine quantité de maltose. Dans la molécule de maltose les deux unités glucosidiques sont liés par la liaison α 1,4 dans le glycogène.

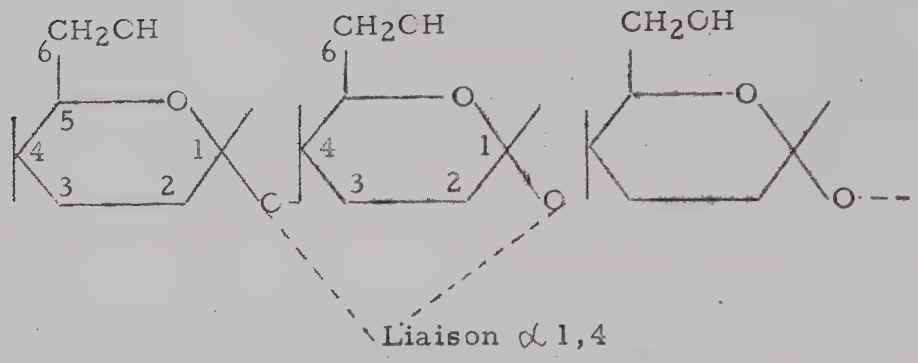


Figure 3

L'amylose est consituté par la liaison ∝ 1,4. Ce fait, associé à une rotation spécifique identique montre la similarité entre le glycogène et l'amylose. Mais la différence s'affirme dans la coloration à l'iode, et le comportement osmotique et viscosimétrique de ces deux polysaccharides. De plus l'amylose est cristallin à l'inverse du glycogène qui est amorphe.

Toutes ces différences sont dues aux disparités constitutionnelles de l'amylose et du glycogène qui ont été élucidées par les analyses chimiques telles que la méthylation ou par la technique de la dégradation enzymatique.

L'étude de méthylation a montré que dans le glycogène, un certain pourcentage de molécules de glucose est lié par la liaison ∝ 1,6 glucosidique.

L'existence de liaisons glucosidiques autres que les liaisons ∝ 1,4 et ∝ 1,6 n'a pu être prouvé d'une façon définitive. Meyer (1951) n'a trouvé que des liaisons ∝ 1,4 et ∝ 1,6 dans la molécule de glycogène.

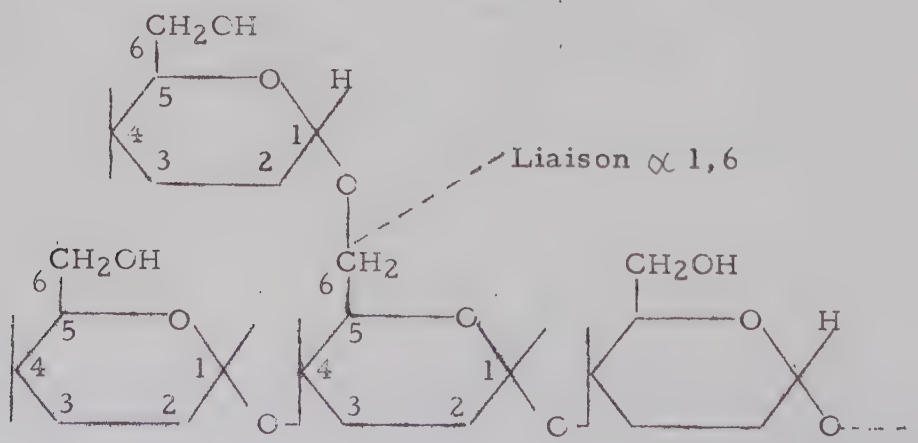
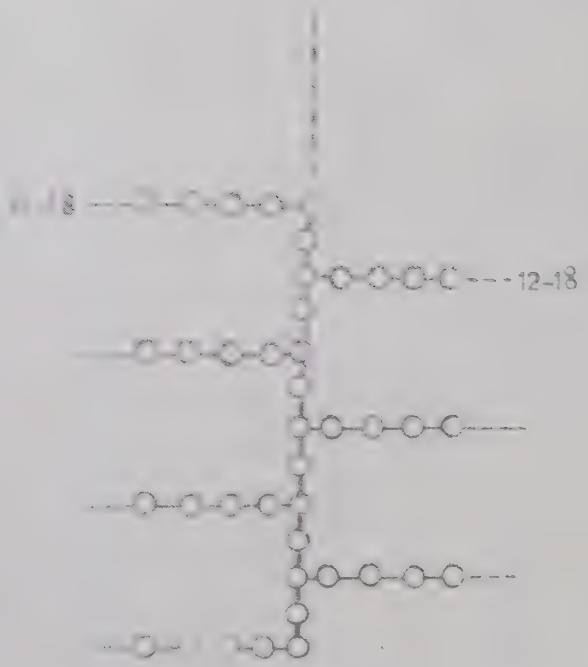
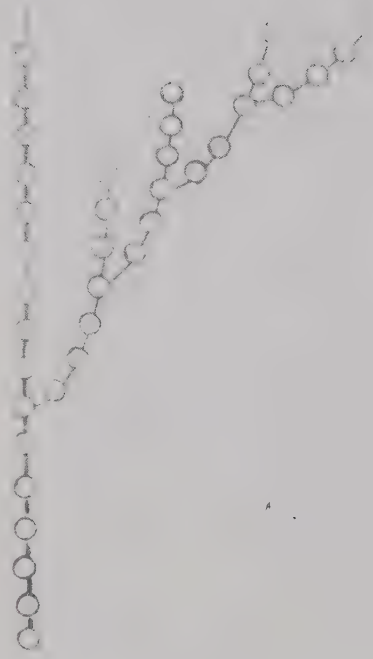


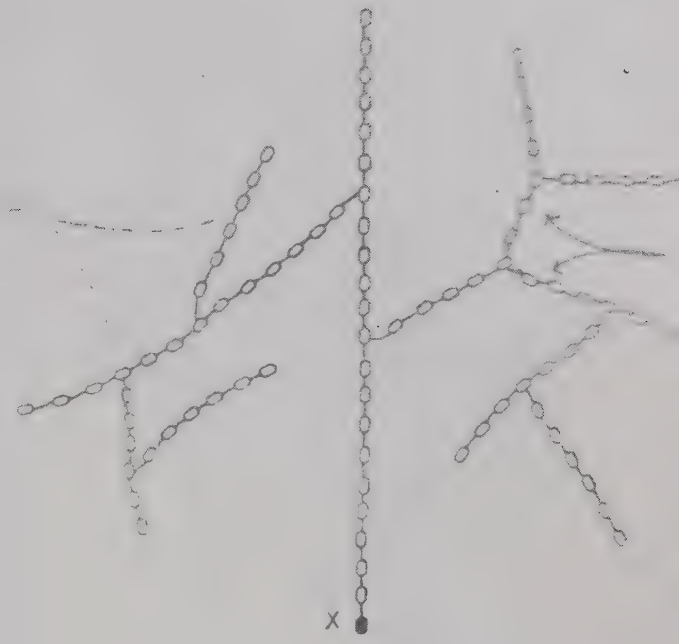
Fig. 4.- Liaison ∝ 1,6 dans la molécule du glycogène.



Structure du glycogène
selon STAUDINGER



Structure du glycogène
selon HAWORTH



Structure du glycogène
selon MEYER

La présence des liaisons α 1,6 parle en faveur d'une structure ramifiée. Staudinger a imaginé que la molécule du glycogène est constituée par une chaîne glucosidique d'une centaine de molécules de glucose. Chacune d'elles porterait une branche constituée par 12 à 18 molécules de glucose. Mais les études de la dégradation du glycogène par la β amylase ont montré que cette enzyme décompose le glycogène en un reste polysaccharide de poids moléculaire assez élevé (dextrine-limite). Ce polysaccharide, après avoir été soumis à l'attaque d'une enzyme spécifique pour les liaisons α 1,6, est encore capable d'être digérée par la β amylase. Le glycogène ainsi peut être complètement digéré par l'attaque successive de la β amylase et l'amylo-1,6-glucosidase. Ce phénomène prouve que la ramification du glycogène n'est pas aussi simple que la structure de la molécule proposée par Staudinger.

Haworth a proposé pour le glycogène une structure "laminée" (fig. 5). Selon cet auteur, chaque branche amylosique du glycogène serait attachée à une autre branche précédente par la liaison α 1,6. Meyer a montré qu'un polysaccharide avec une structure telle qu'elle a été imaginée par Haworth donnerait une chaîne allongée comme un fil. L'acétate de cette molécule donnerait une lame élastique après évaporation de la solution de cet acétate sur une plaque de verre. Or, il n'en est rien.

Finalement Meyer a proposé une structure de glycogène comme un arbre muni des branches irrégulières (fig. 5). Cet auteur est parvenu à élucider la structure par la dégradation systématique de la molécule du glycogène par la β amylase et suivie par l'amylo-1,6-glucosidase.

Selon Meyer, les chaines extérieures ou les chaines latérales du glycogène contiennent de 6 à 7 unités glucosidiques en liaison amylosique et les chaines amylosiques entre deux liaisons α 1,6 contiennent 3 unités glucosidiques.

Plus tard, Illingworth, Larner et Cori (1952) ont étudié la structure du glycogène et la longueur des chaines amylosiques par une dégradation systématique par la phosphorylase, suivie par l'amylo-1,6-glucosidase. Ils sont arrivés à la conception de Meyer sur la structure du glycogène. Ces derniers auteurs ont remarqué que les chaines amylosiques périphériques ont des restes glucosidiques de 11 à 13 unités et les chaines amylosiques entre deux liaisons 1,6 contiennent 5,5 unités glucosidiques en moyenne.

La structure du glycogène comme "un arbre muni des branches" est généralement accepté par tous les biochimistes malgré le fait que la structure proposée par Haworth ne soit pas totalement rejetée (Manners 1957).

DESMO- ET LYOGLYCOGENE

Le glycogène du foie et du muscle n'est pas homogène. Wilstätter et Rhodewald, en 1934, ont remarqué que le glycogène dans le tissu peut être séparé en deux fractions. L'une des deux fractions est liée à la protéine et difficilement soluble dans l'eau tandis que l'autre fraction est libre et facilement soluble dans l'eau. Ces auteurs ont dénommé la fraction liée à la protéine, le desmoglycogène, et la fraction libre, le lyoglycogène.

Mais selon Meyer (1943) cette différence relèverait d'une différence de poids moléculaires entre ces deux fractions de glycogène. Selon cet auteur le desmoglycogène de Wilstätter et Rhodewald a un poids moléculaire plus élevé que le lyoglycogène. C'est pour cette raison qu'il est difficilement soluble dans l'eau.

Bloom, Lewis, Schumpert, et Shen (1951) ont remarqué qu'une fraction de glycogène du foie et du muscle de cobaye est soluble dans l'acide trichloracétique (TCA) tandis que l'autre fraction est insoluble. Selon ces auteurs c'est la fraction soluble dans l'acide qui est facilement mobilisée par le jeûne et par les agents pharmacodynamiques tels que l'adrénaline. F. Meyer et Lourau ont identifié la fraction soluble dans l'acide avec le lyoglycogène et la fraction insoluble dans l'acide avec le desmoglycogène de Wilstätter et Rhodewald. Lourau et Meyer (1958) ont constaté que la fraction de glycogène liée aux protéines hépatiques n'incorpore le carbone C^{14} qu'avec un certain retard et paraît être assez distinct de la fraction libre de glycogène.

Selon Stetten et Stetten (1957), dans le foie, les petites molécules du glycogène sont plus activement métabolisées que les grosses. Dans le muscle c'est le phénomène inverse qui se produit.

Chapitre III

A. LA PHOSPHORYLASE D'ORIGINE ANIMALE

La phosphorylase a été trouvée dans le muscle (Cori et Cori 1936), dans le myocarde, dans le foie, et dans le cerveau (Cori, Colowick et Cori 1938). Mirski (1942) a démontré l'activité phosphorylasique dans le tissu adipeux. La phosphorylase et l'enzyme branchant de la graisse jaune de rats ont fait l'objet d'études de Creasey et Gray (1951). Wagner (1950) et Rhodewald (1952) ont recherché l'activité phosphorylasique dans les leucocytes. Giusi (1958) a recherché, en vain, l'activité dans les globules rouges. La phosphorylase de l'utérus humain a été étudiée par Brody (1958) et celle de la ratte par Leonard (1958, 1960) et par Herbener et Atkinson (1969).

Cowgill (1959 a,b) a recherché la phosphorylase, la phosphorylase-phosphatase, et la phosphorylase-kinase dans le muscle de la langoustine. Cavier et Savel (1953) ont recherché la phosphorylase chez l'ascaris du porc (Ascaris lumbricoïdes Linné), Mansour (1959) et Mansour et ses collaborateurs (1960) dans la douve du foie, Fasciola hepatica.

Goranson, McBride, et Weber (1954) et Hadjiolov et Dancheva (1958) ont examiné l'activité phosphorylasique dans les tumeurs solides. Wu (1959) s'est penché sur l'activité phosphorylasique des cellules HeLa (tumeur ascitique d'origine humaine) et Nirenberg (1959) a recherché la phosphorylase dans les diverses tumeurs ascitiques et dans le sarcome de Roux.

En effet, cette enzyme est très répandue dans les tissus des animaux.

B. LA PHOSPHORYLASE D'ORIGINE VEGETALE

Hanes (1940) a recherché l'activité phosphorylasique des germes de petits-pois. Il a remarqué que l'action de cette phosphorylase est réversible. Il a pu isoler le glucose-1-phosphate synthétisé par la phosphorylase.

La phosphorylase de la pomme de terre a fait également l'objet d'études de Hanes (1940b). L'enzyme de cette origine a été purifiée par d'autres chercheurs (Bernfeld 1951). Cette enzyme a un pH entre 5,9 et 6,1. L'acide adénylique est incapable de l'activer. Elle existe sous une seule forme, la forme active. Les agents réducteurs n'ont aucune action sur elle.

Cette enzyme est légèrement inhibée par le glucose, le fructose et par le saccharose (Hanes 1940b). La phlorhizine l'inhibe légèrement (Bernfeld 1951). L'amylase χ cristallisée de la patate douce et cette enzyme d'autre origine est capable d'inhiber l'activité de la phosphorylase de la pomme de terre.

La phosphorylase de "jack-bean" a été purifiée 10 00 fois par Sumner, Chou et Bever (1950). Le pH optimum a été trouvé égal à pH 6,4. La température optima est de 55°C. Cette enzyme n'est activée ni par la cystéine ni par le 3'-AMP. Elle n'est pas inhibée par le D-glucose. Ces auteurs ont trouvé que cette phosphorylase contient 4 µg de flavine adénine dinucléotide (FAD) par mg de protéine sous forme de groupe prosthétique. Ce groupe prosthétique n'est pas détruit par une simple dialyse, mais il peut l'être en chauffant l'enzyme. Cette phosphorylase est complètement détruite par l'action de la trypsine tandis que le FR-enzyme n'a aucune action sur elle.

Dans tous les cas, la phosphorylase cristallisée de tissus végétaux a besoin d'un "primer" pour la synthèse du polysaccharide. L'amylose est le primer le plus efficace (Hanes 1940; Sumner et coll. 1950). Le maltose est aussi capable de jouer le rôle de "primer" pour la phosphorylase de la pomme de terre (Hanes 1940b).

Frederick (1959) a recherché la phosphorylase chez trois genres d'algues (Oscillatoria, Nostoc et Gloecapsa) appartenant à la famille Cyanophycae.

C. PHOSPHORYLASE DES BACTERIES

Hehre (1949) a constaté que l'extrait cellulaire de Niesseria perflava, une variété de bactérie qui existe dans la gorge humaine, est capable de synthétiser le polysaccharide à partir du glucose-1-phosphate. Le polysaccharide synthétisé par cette bactérie in vitro ressemble plutôt au glycogène qu'à l'amylopectine.

Carlson et Hehre (1949) ont remarqué que le bacille diphtérique Corynebacterium diphtheriae est capable de synthétiser le polysaccharide à partir du glucose-1-phosphate par l'action de la phosphorylase. Ce polysaccharide est constitué par deux fractions distinctes : l'une ressemble à l'amylose et l'autre a des propriétés se situant entre l'amylose et l'amylopectine qui est décelé par la réaction à l'iode et par d'autres réactions chimiques.

Chapitre IV

A. LES ACIDES AMINES DE LA PHOSPHORYLASE

Velick et Wicks, en 1951, ont analysé les acides aminés de la phosphorylase. Cette analyse a été réalisée par les méthodes : a) microbiologiques ; b) isotopiques ; et c) chimiques.

a) Dosage microbiologique

Cette méthode a été employée pour doser 15 acides aminés. La valine, la leucine, l'isoleucine et l'acide glutamique ont été dosés par le lactobacille et la thréonine a été dosée par lactobacillus fermenti. Le reste des dosages microbiologiques a été réalisé au moyen de leuconostoc mésenteroïdes.

b) Dosage isotopique

Cette méthode a été employée pour doser 6 acides aminés. La technique originale pour les acides aspartique et glutamique, la sérine, la thrénnine et l'hydroxyproline a été modifiée pour déterminer la glycine et l'alanine.

c) Dosage chimique

La cystine, la tyrosine, l'azote total ont été dosés par les méthodes chimiques (spectroscopie et par la méthode de l'azote total).

Les résultats de cette méthode sont résumés dans le tableau ci-après.

En dehors des acides aminés Velick et Wicks (1951) ont recherché le groupe prosthétique de la phosphorylase par les méthodes microbiologiques et chimiques.

Pour le dosage de l'adénine, Neurospora Crassa 28610 a été employé. Le dosage sur 28 grammes de la phosphorylase a montré un résultat négatif. Dans les conditions de cette expérience, l'existence de 5 μg d'adénine au minimum a pu être décelée. Les auteurs ont alors conclu que la phosphorylase ne contient pas d'acide adénylique.

La vitamine B_6 a été dosée par la méthode microbiologique en employant Neurospora sitophilia 299. Cette méthode permet de révéler l'existence de

Tableau I

Les acides aminés de la phosphorylase (d'après Valick et Wicks 1951)

	g. pour 100 g de protéine	déviation moyenne	g.azote/ 100 g. protéine	
Glycine	4,5	0,2	-	Microbiologique
"	3,8	-	0,71	Isotope
Alanine	4,79	-	0,75	"
Valine	7,3	0,1	0,87	Microbiologique
Leucine	10,5	0,3	1,12	"
Isoleucine	6,5	0,3	0,69	"
Méthionine	2,7	0,2	0,25	"
Cystine	0,43	0,05	0,06	"
"	0,45	..	..	Colorimétrique
Proline	4,7	0,3	0,57	Microbiologique
Arginine	11,6	0,6	3,73	"
Histidine	3,3	0,1	0,89	"
Lysine	7,2	0,3	1,38	"
Acide Asparatique	11,6	..	..	"
" "	9,3	.	0,98	Isotope
Acide glutamique	13,8	0,3	..	Microbiologique
" "	13,8	..	1,29	Isotope
Phényl-alanine ...	6,2	0,5	0,53	Microbiologique
Tyrosine	5,9	0,2	0,46	Colorimétrique
Trytophane	2,0	0,06	0,27	Absorp. Ultraviolet
Sérine	3,8	0,3	..	Microbiologique
"	3,05	..	0,40	Isotope
Thréonine	4,5	0,5	..	Microbiologique
"	4,24	..	0,59	Isotope
Amide N	1,2	..	1,2	Micro-diffusion

0,05 à 0,06 µg de pyridoxine. Mais la pyridoxine, la pyridoxamine, et le pyridoxal ne sont pas identifiés par cette méthode. Les auteurs ont remarqué que l'enzyme, deux fois cristallisée, contient un peu plus d'un mole de pyridoxine par mole de protéine. La phosphorylase, 4 fois cristallisée, ne contient que 0,5 mol. de pyridoxine par mole de protéine et 10% de cette substance peut être évaluée comme pyridoxine par mole de protéine et 10% de cette substance peut être évaluée comme pyridoxal-5-phosphate. Les auteurs, pour cette raison, ne croient pas que les dérivés de vitamine B6 jouent le rôle du groupe prosthétique. De plus, selon ces auteurs, la phosphorylase est catalytiquement active, même en l'absence de pyridoxine. La phosphorylase b n'est pas activée par le pyridoxal-5-phosphate.

Ces auteurs trouvent 3 mols de phosphate pour chaque mol. de protéine.

B. CO-ENZYME OU LE GROUPE PROSTHETIQUE DE LA PHOSPHORYLASE

Recherches avant 1955

Dès leurs premières recherches sur la phosphorylase du muscle, Cori et ses collaborateurs (1936) ont remarqué que la présence d'AMP est nécessaire pour cette réaction. Bientôt Cori et Cori (1943) sont arrivés à la conception de l'existence de deux formes de la phosphorylase, l'une active; la forme a et l'autre inactive, la forme b. La forme b (forme inactive) est activée en présence d'AMP tandis que la phosphorylase a est active même en l'absence d'AMP. La concentration optima d'AMP pour l'activation de la phosphorylase b a été trouvée égale à 5×10^{-6} M. Mais même en 1936, Parnas et Mochnaka ont signalé que l'AMP, à cette concentration, ne persiste pas dans le muscle. Selon ces derniers auteurs, l'acide inosique qui s'accumule dans le muscle peut jouer le rôle d'activateur. L'activation induite par l'AMP est due à sa transformation en acide inosique. Mais Cori et Cori (1940) ont remarqué que l'acide inosique est incapable de remplacer l'acide adénylique comme le facteur co-enzymatique de la phosphorylase.

Cori et Green (1943) ont trouvé dans le muscle, une enzyme (PR-enzyme) qui transforme la phosphorylase a en forme b. Ces auteurs ont cru que la phosphorylase a contient l'acide adénylique comme groupe prosthétique. Ce groupe prosthétique est alors enlevé par l'enzyme inactivateur (PR-enzyme) donnant naissance à la phosphorylase b. Pour cette raison cette enzyme a été nommée "Prosthétique groupe-Removing enzyme".

Plus tard, en 1945, en étudiant la cinétique du PR-enzyme Cori et Cori (1945) n'ont pu prouver la libération de l'acide adénylique de la phosphorylase a par l'action de la PR-enzyme. Le problème du groupe prosthétique restait encore ouvert. Mais leurs études ont pu éluciter les propriétés de ces deux formes de cette enzyme.

Ces propriétés sont résumées dans le tableau II ci-après.

Cori et Cori (1945) ont trouvé que la PR-enzyme est activée de 2 à 4 fois en présence de la cystéine. Les ions Mn^{++} activent cette enzyme. Par contre, les ions Mg^{++} ont une action inhibitrice. Les esters de phosphate tels que le glucose-1-phosphate (0,03 M), le mannose-1-phosphate et les ions bivalents, surtout le sulfate, ont une action inhibitrice sur la PR-enzyme. La libération de phosphate à partir de la phosphorylase a sous l'influence de la PR-enzyme est prouvée mais la libération d'AMP n'a pu être démontrée. Nous verrons plus tard que Velick et Wicks (1951) n'ont pu obtenir aucune preuve de l'existence de l'acide adénylique ni dans la phosphorylase a, ni dans la phosphorylase b du muscle.

Tableau II

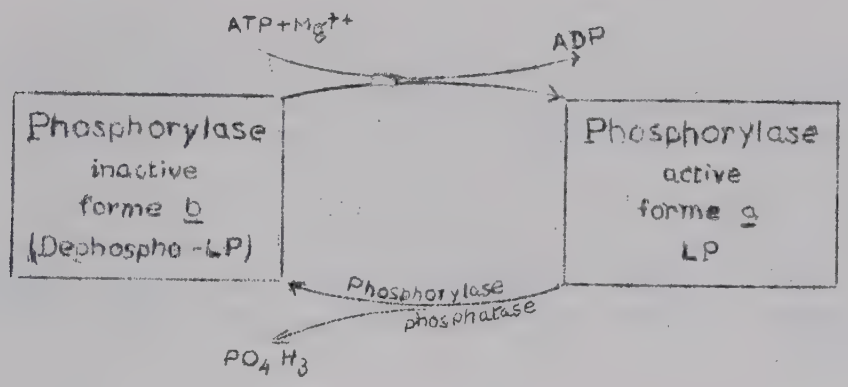
Comparaisons de propriétés des phosphorylases a et b
(d'après Cori et Cori 1945)

	Phosphorylase a	Phosphorylase b
a) Poids moléculaire calculé d'après la diffusion et l'ultracentrifugation	4×10^{-5}	--
b) Constante de diffusion $D_{20\,w} \times 10$	3,3	3,3
c) Mobilité électrophorétique (tampon phosphate pH 7,2)	-3,25	-2,75
d) Point isoélectrique	5,5-5,6	5,8
e) Solubilité à pH 7,2 à l'eau	Insoluble	Soluble
0,1 M KCl à 24°	Soluble à peine	"
0,08 M KCl + 0,02 M à 24°	Soluble	"
f) Forme cristalline	Aiguilles	Plaques rhomboïdes
g) Activité		
sans AMP	65	0
avec AMP	100	80
h) Constante de dissociation pour la combinaison avec 5'-AMP	$1,5 \times 10^{-6}$	5×10^{-5}
i) Phosphore	0,08	0,02

En 1953, Keller et Cori, à la recherche de l'action de la Prosthétique group-Removing enzyme sur la phosphorylase a, ont remarqué que la formation de la phosphorylase b est accompagnée d'une division de la molécule de la phosphorylase a en deux. Chaque molécule de la phosphorylase ainsi formée a un poids moléculaire moitié moindre de celui de la phosphorylase a (le poids moléculaire de la phosphorylase a est de 500,000). Puisque la séparation du groupe prosthétique par la "Prosthétique groupe--Removing enzyme" n'a pas été prouvée, on l'a redéonommée "Phosphorylase-Rupturing enzyme". On voit, donc, que le problème de la transformation de la phosphorylase a en forme b était résolu mais le problème de la transformation de la phorphorylase b en phosphorylase a restait encore à résoudre.

Recherches effectuées après 1955

En 1956, Sutherland et ses collaborateurs ont réussi à préciser les conditions dans lesquelles la phosphorylase du foie devient active. D'après ces auteurs l'équilibre d'activation dans le foie n'est pas tributaire d'AMP, mais de la phosphorylase-phosphatase (équivalent de la FR-enzyme) et de la phosphorylase-kinase. La phosphorylase du foie qui est une protéine phosphorylée, est inactivée par la perte de phosphates. Une enzyme, la phosphorylase-phosphatase, joue ce rôle d'activateur. La phosphorylase inactive (LP-inactive), ainsi produite, est réactivée par une kinase, la déphospho-phosphorylase-kinase, en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ions magnésium. Cette activation s'accompagne d'une phosphorylation des molécules de la phosphorylase.



PHOSPHORYLASE DU FOIE

Figure 6

La concentration de la phosphorylase résulte d'un équilibre entre ces deux systèmes antagonistes présents dans le foie et dans le coeur (Rall et collaborateurs 1956); Sutherland et Cori (1951) avaient déjà remarqué qu'une différence existe entre la phosphorylase du muscle et celle du foie. La forme inactive de la phosphorylase du foie n'est pas activée en présence d'AMP, à l'inverse de ce qui se passe dans le muscle.

Krebs et ses collaborateurs (1955) ont constaté que dans le muscle, à l'état de repos, la phosphorylase existe surtout sous la forme inactive (forme b). Fischer et Krebs (1955) ont observé que la phosphorylase b du muscle est transformée en phosphorylase a (forme active) en présence d'ATP et d'ions de métaux bivalents. Ils ont soupçonné alors l'intervention d'une enzyme dans ce système de transformation. Plus tard ils ont pu isoler cette enzyme (Krebs et coll. 1958). Cette enzyme est appelée "Phosphorylase-b-kinase" par ces auteurs.

PHOSPHORYLASE DU MUSCLE

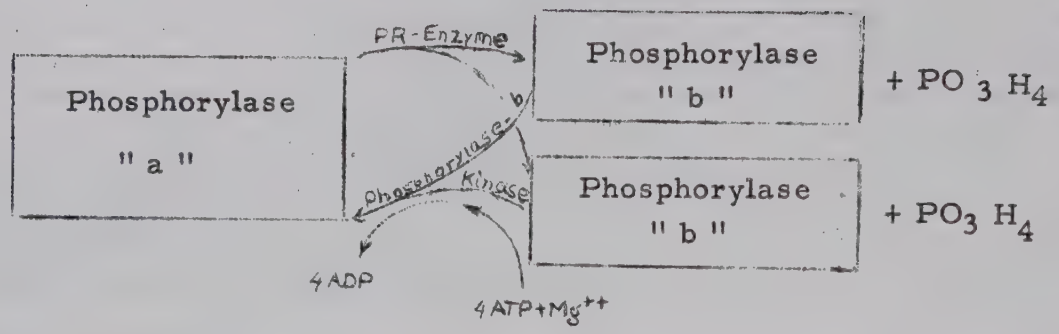


Figure 7

De plus, Krebs et ses collaborateurs (1957) ont constaté que l'activation de la phosphorylase b par l'AMP est un phénomène indépendant et qui n'a aucune relation avec la transformation de la forme b en forme a.

En 1956, en étudiant l'action du para chloromercuro-benzoate (PCMB), Medsen et Cori ont observé que la molécule de la phosphorylase a est divisée en quatre sous-unités de poids moléculaire égal. (Le poids moléculaire de la phosphorylase a étant 500,000, chaque sous-unité devait avoir le poids moléculaire de 125,000).

Baranowski, Illingworth, Brown, et Cori (1957) ont observé que la molécule de la phosphorylase a possède 8 mols de phosphates dont quatre sont fermement liés à la protéine et les autres 4 mols de phosphate sont labiles et libérés sous forme de phosphate inorganique.

Ces auteurs ont pu isoler les 4 mols de phosphates fermement liés à la protéine, et les ont identifiés comme le pyridoxal-5-phosphate. Ils ont comparé la propriété du pyridoxal-5-phosphate synthétique et du pyridoxal-5-phosphate isolé à partir de la phosphorylase. Ils ont trouvé que (a) le coefficient d'extinction molaire basé sur l'analyse de phosphate, (b) l'électrophorèse sur papier, (c) la chromatographie sur colonne, (d) le spectre d'absorption dans la solution acide et dans la solution alcaline, (e) l'activation de l'apoenzyme aspartique-glutamique transaminase, (f) les diverses réactions colorimétriques, ont donné des résultats identiques.

De plus, la pyridoxamine-5-phosphate, l'acide adénylique (AMP) et d'autres nucléotides n'ont pas été trouvés dans la molécule de la phosphorylase a. L'absence du pyridoxal, de la pyridoxamine, et de la pyridoxine a été constaté par ces auteurs. Le pyridoxal-5-phosphate est fermement lié à la protéine. Il n'est pas séparé de la molécule de la phosphorylase par une simple dialyse ou par l'absorption sur le charbon "Norit".

Cori et Illingworth (1957) ont constaté que la phosphorylase a et b du muscle contiennent une quantité stéochimétrique de pyridoxal-5-phosphate. Il semble que les 4 mols du pyridoxal-5-phosphate soient également réparties dans les 4 sous-unités de la phosphorylase a. La phosphorylase est inactivée catalytiquement par la perte de pyridoxal-5-phosphate. Cette apoenzyme (la phosphorylase a sans le pyridoxal-5-phosphate) est réactivée lorsqu'elle est incubée pendant 30 minutes à 30°C. en présence d'une quantité de pyridoxal-5-phosphate légèrement supérieure à celle qui a été enlevée à la protéine.

La pyridoxamine-5-phosphate etle pyridoxal sont incapables de remplacer le pyridoxal-5-phosphate. Le ω-méthyl pyridoxal-5-phosphate est capable d'activer l'apophosphorylase a jusqu'à 50% par rapport au pyridoxal-5-phosphate (Illingworth et coll. 1958). D'après ces résultats Cori et Illingworth (1957) concluent que le pyridoxal-5-phosphate est le groupe prosthétique de la phosphorylase et non le 5-AMP comme on le croyait autrefois.

Krebs et ses collaborateurs (1957) et Illingworth et ses collaborateurs (1958) ont trouvé que le pyridoxal-5-phosphate n'est pas lié à la protéine par une base de Schiff. Selon Krebs et ses collaborateurs la liaison est celle d'une aldamine substituée. Plus tard, ces auteurs ont trouvé que le pyridoxal-5-phosphate est lié à un groupe ε-amino de lysine de la phosphorylase.

D'après ces données et d'après Velick et Wicks (1951) l'AMP n'est pas le groupe prosthétique de la phosphorylase. Quel est donc le mécanisme d'activation de la phosphorylase par le 5-AMP ? Selon Madsen et Cori (1954) l'AMP active la phosphorylase en baissant l'énergie de l'activation. L'énergie d'activation de la phosphorylase a est de 25.000 calories par molécule à une température comprise entre 15° et 25°C. Selon ces auteurs, l'énergie d'activation pour la phosphorylase b est à peu près égale à celle de la phosphorylase a en présence d'acide adénylique. De plus, Madsen et Cori (1957) ont observé que la phosphorylase a du muscle est pourvue de 4 centres actifs pour l'AMP tandis que la phosphorylase b n'en a que deux. Ce fait a été confirmé par Hadjiolov et Dancheva (1959) pour la phosphorylase du foie. Pour ces derniers auteurs les autres mononucléotides tels que l'acide inosique (IMP), l'acide cytidique (CMP) et l'acide uridique (UMP) peuvent être liés par la phosphorylase du foie à l'inverse de celle du muscle.

C - LES CENTRES PHOSPHORYLES DANS LA MOLECULE DE PHOSPHORYLASE

Dans la molécule de phosphorylase, 8 molécules de phosphate sont liées à chaque molécule de protéine : 4 d'entre elles sont fortement liées à la molécule de protéine. Les 4 autres molécules de phosphate sont labiles.

La molécule de la phosphorylase a est constituée par quatre sous-unités de poids moléculaire égal (Madsen et Cori 1956). Si les molécules de phosphate sont également distribuées dans les 4 sous-unités, chaque sous-unité devrait avoir une molécule de phosphate fortement liée et l'autre molécule de phosphate instable.

Le phosphate labile de la protéine est libéré par la phosphorylase phosphatase (PR-enzyme) sous forme de phosphate inorganique pendant la transformation de la phosphorylase a en forme b. Fischer, Graves, Crittenden et Krebs (1959) ont déterminé la structure des centres phosphorylés de la molécule de la phosphorylase. Dans cette réaction, la phosphorylase b est phosphorylée par le phosphate marqué sous l'influence de la phosphorylase kinase.

Le phosphate ainsi introduit dans la molécule de la phosphorylase est stable à l'acide mais labile en solution alcaline. Ce phénomène prouve que le phosphate n'est pas lié à la protéine par une liaison phosphorique de "haute énergie". Mais les propriétés indiquées sont caractéristiques des phosphoprotéines dans lesquelles le phosphate est lié à un reste ortho-séryl.

Par une réaction presque instantanée un hexapeptide contenant le phosphate est libéré par la trypsine. Ces auteurs (Fischer et coll. 1959) ont purifié cet hexapeptide et ont déterminé par une dégradation enzymatique les séquences des acides-aminés. L'analyse de l'enchaînement indique que le phosphopeptide a les séquences suivantes :

Lys. Glu NH_2 . Ileu. Sér P. Val. Arg.

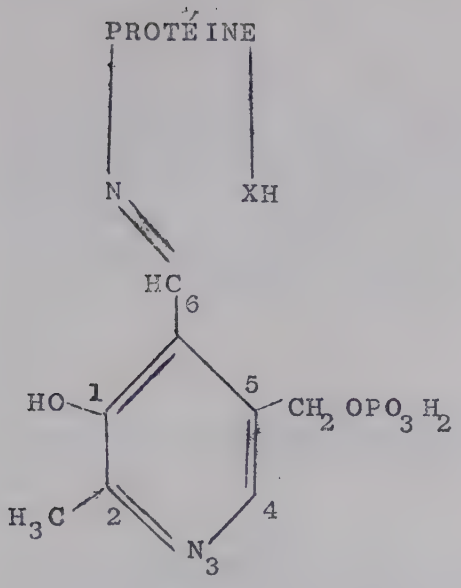
Les auteurs ont calculé que des 34 à 46 restes séryliques de la sous-unité phosphorylasique, un seul est phosphorylé.

Baranowski, Illingworth, Brown et Cori (1957) ont pu identifier les 4 phosphates stables de la phosphorylase a. Selon ces auteurs, ces phosphates sont liés à la protéine sous forme de pyridoxal-5-phosphate.

Cori et Illingworth (1957) considèrent ce pyridoxal-5-phosphate comme le groupe prosthétique de l'enzyme. La phosphorylase est inactive sans le pyridoxal-5-phosphate.

Krebs, Kent, Graves et Fischer (1957) ont observé que le pyridoxal-5-phosphate possède une liaison stable avec la protéine. Ce nucléotide n'est pas lié à la protéine par une base de Schiff, qui est la forme de liaison la plus usuelle de pyridoxal-5-phosphate avec d'autres enzymes dont il est le groupe prosthétique.

Ces derniers auteurs ont constaté que la liaison doit se faire par l'aldamine substitué ou comme le dérivé d'une amine secondaire :



Liaison par la base de Schiff

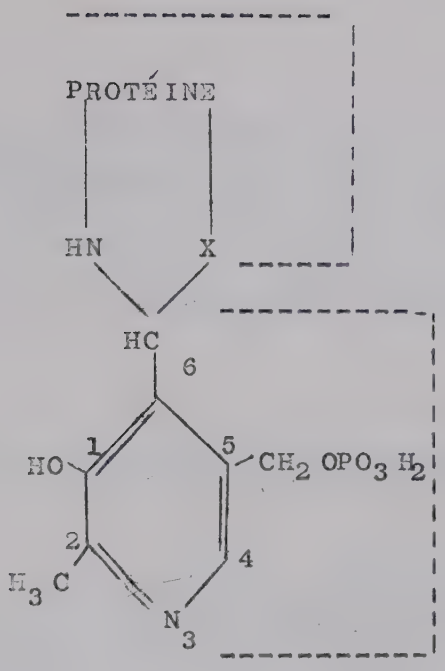


Figure 8 Liaison du pyridoxal-5-phosphate selon KREBS et coll. (1957)

Illingworth et ses collaborateurs (1958) ont aussi confirmé que le pyridoxal-5-phosphate n'est pas lié à la phosphorylase par une base de Schiff.

Plus tard, Fischer et ses collaborateurs (1959) ont trouvé que le pyridoxal-5-phosphate est lié à un groupe ε-amino de la lysine de cette enzyme. Mais ce reste lysine n'est pas le même que celui que l'on trouve dans l'hexapeptide libéré par la trypsine.

Ces auteurs ont résumé la structure de la phosphorylase par rapport aux centres phosphorylés dans le schéma suivant :

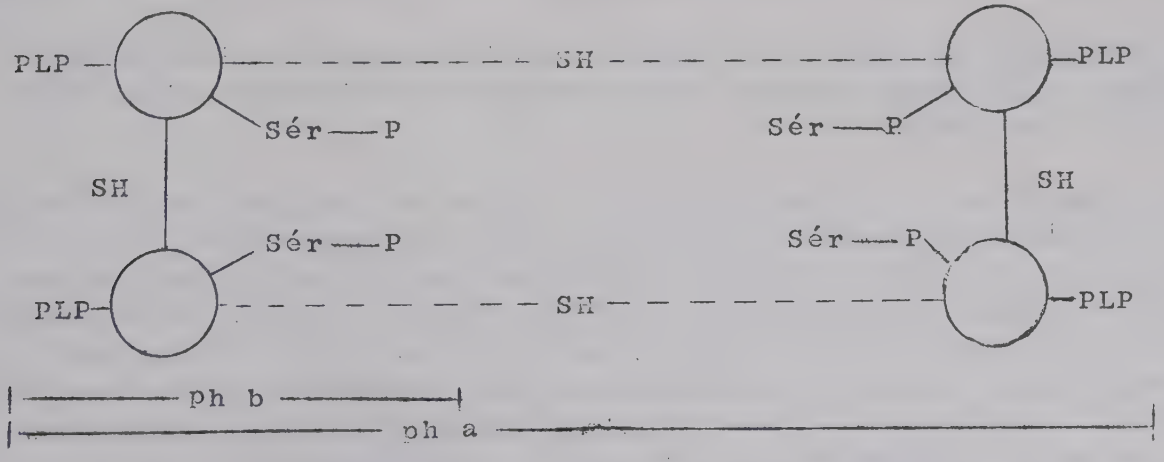


Fig. 9. - Schéma représentant la relation des molécules de phosphates (d'après Neilands et Stumpf 1958)

PLP : Pyridoxal-5-phosphate
SH : Les groupes sulfhydrilés
Sér-P : Sérine phosphate (phoshpate hydrolysable par le FR-enzyme)

Chapitre V

QUELQUES PROPRIETES DES PHOSPHORYLASES-KINASES

PHOSPHORYLASE KINASE DU MUSCLE (phosphorylase-b-kinase)

Krebs et ses collaborateurs (1958) ont démontré que la phosphorylase b du muscle est phosphorylée et en même temps dimérisée par la phosphorylase-b-kinase. Selon Fischer, Graves, Crittenden et Krebs (1959) la phosphorylation de la molécule de phosphorylase est essentielle pour l'activation. La dimérisation ne joue qu'un rôle secondaire dans la transformation de la phosphorylase b en forme a.

Le système de transformation des deux formes de phosphorylase est actif seulement en présence de l'ATP et Mg^{++}. Mais les ions de Mg^{++} dans cette activation peuvent être remplacés par d'autres ions bivalents tels que les ions Mn^{++}, Sr^{++}, Ca^{++}. L'ATP n'est pas remplaçable par l'ADP ou l'AMP (Fischer et Krebs 1955). Les autres trinucléotides tels que le cytidine triphosphate (CTP), l'inosine triphosphate (ITP) sont aussi incapables de remplacer l'ATP. Seulement, l'uridine triphosphate (UTP) a démontré une légère activation, mais les auteurs de cette étude soupçonnent une contamination.

Ce système de transformation n'est pas inhibé par l'addition de F^- (0,01 M), l'arsénate (0,015 M) ou de cystéine (0,06 M) (Fischer et Krebs 1955).

L'éthylénediamine tétraacétate (EDTA) inhibe totalement l'activité de cette enzyme. Mais cette inhibition est réversible par l'addition d'ions Mg^{++}, Mn^{++} ou Ca^{++} en excès.

Le pH optimum de la phosphorylase-b-kinase est aux environs de pH 9,0 (Krebs et Fischer 1956). La kinase est vite inactivée au-dessous de pH 6,0. Plus tard, Krebs, Graves et Fischer (1959) ont trouvé que la phosphorylase-b-kinase peut être isolée à partir du muscle de lapin, sous une forme qui n'a aucune activité à pH 7,0 et au-dessous. La kinase inactive à pH 7,0 est activée au-dessous de pH 7,0 par une incubation préalable avec les ions Ca^{++}. Cette sorte d'activation est irréversible. La kinase pH 7-inactive est aussi activée par une pré-incubation avec l'adénosine triphosphate (ATP) en présence des ions Mg^{++}. Ce phénomène a conduit les auteurs à suggérer une hypothèse. Selon ces auteurs, la phosphorylase-b-kinase elle-même existe sous deux formes, l'une phosphorylée, et l'autre déphosphorylée, qui sont active et inactive d'une manière analogue à celle des phosphorylases a et des

phosphorylases b. Les systèmes enzymatiques constitués par une kinase et par une phosphatase doivent être responsables pour l'activation et pour l'inactivation de la phosphorylase-b-kinase. L'activation de la kinase, pH 7 inactive par l'ATP et Mg^{++} est renforcée sous l'influence du 3,5-AMP cyclique.

PHOSPHORYLASE-KINASE DU FOIE (Déphosphophosphorylase-kinase)

Rall, Sutherland et Wosilait (1956) ont étudié la phosphorylase kinase de cet organe. La phosphorylation de la phosphorylase inactive par la kinase n'est pas accompagnée d'une dimérisation de la protéine. L'ATP et Mg^{++} sont absolument nécessaires pour activer cette kinase.

L'uridine triphosphate (UTP), l'inosine triphosphate (ITP), le cytidine triphosphate (CTP), l'adénosine diphosphate (ADP) et l'acide adénylique (AMP) sont incapables de remplacer l'ATP dans le système kinasique.

En l'absence d'ions Mg^{++} les ions Mn^{++} et Ca^{++} ne montrent aucune activation. Le fluorure de sodium n'inhibe pas la réaction kinasique.

Chapitre VI

A. EFFET DES ENZYMES SUR LA PHOSPHORYLASE

CARBOXYPEPTIDASE

Cette enzyme n'a aucun effet sur l'activité de la phosphorylase a purifiée du muscle (Cori et Green 1943).

ADENYLIQUE DEAMINASE

Cette enzyme n'a aucune action inhibitrice sur la phosphorylase (Cori et Green 1943).

RIBONUCLEASE

Cori et Green (1943) ont constaté que la ribonucléase n'a aucun effet sur la phosphorylase a.

TRYPSINE

L'activité de cette enzyme sur la phosphorylase a fait l'objet d'études de plusieurs auteurs, notamment de Cori et de ses collaborateurs, de Keller et ses collaborateurs, et de Krebs et ses collaborateurs.

Cori et Green (1943) ont constaté que la trypsine à pH 6,0 transforme la phosphorylase a en forme b. En 1945, Cori et Cori ont remarqué que la transformation de la phosphorylase a en forme b sous l'influence de la trypsine est accompagnée d'une libération de phosphate sous forme organique. Ce phosphate organique est dialysable, mais difficilement hydrolysable dans l'acide.

Krebs (1954), au cours de ses expériences sur l'action de la salmine sur la phosphorylase a cristallisée du muscle, a observé que la forme b de la phosphorylase résultante de l'action de PR-enzyme (phosphorylase-rupturing enzyme) ne réagit pas de même façon que la phosphorylase b produite par l'action de la trypsine. Il a alors conclu que ces deux phosphorylase b de deux origines différentes ne sont pas identiques.

Keller (1955) a étudié la conversion de la phosphorylase a en phosphorylase b sous l'effet de PR enzyme et de la trypsine. Elle a constaté que la constante de sédimentation de ces deux phosphorylases b sont identiques (S.20 W 8,2), mais que la phosphorylase b de la trypsine a des mobilités électrophorétiques distinctes.

Tableau III

Mobilités électrophorétiques des phosphorylases b dans le tampon phosphate; force ionique 0,1 M, pH 7,8

Phosphorylase b	U.cm^2 par sec. par volt
Catalysée par PR enzyme	$-3,7 \times 10^{-5}$
Catalysée par la trypsine	$-4,7 \times 10^{-5}$
Mélange 65% PR enzyme catalysée	$-3,9 \times 10^{-5}$
Mélange 35% trypsine catalysée	$-4,5 \times 10^{-5}$

Dans ces derniers mélanges, la phosphorylase b de trypsine migre vers la cathode. Il est donc bien évident que la trypsine-phosphorylase b a une charge négative nettement supérieure à celle de la PR enzyme-phosphorylase b. Chacune des deux formes de la phosphorylase b est activée par l'AMP.

Rall (1958) a observé que le phosphate organique déchargé sous l'influence de la trypsine peut être identifié avec la phosphosérine.

Fischer, Graves, Crittenden et Krebs (1959), à la recherche des centres de phosphorylation dans la molécule de la phosphorylase a, ont observé que la trypsine, dans une réaction presque instantanée, libère le phosphate sous une forme organique soluble à l'acide, tandis que 95 pour cent de la protéine est précipité par l'acide trichloracétique. Cette protéine est activée par l'AMP, mais la phosphorylase-kinase est incapable de la rephosphoryler (Krebs et coll. 1957).

Le phosphate organique libéré par la trypsine n'est que celui d'un hexapeptide. Les séquences des acides aminés de ce phosphopeptide ont été déterminées. Selon ces auteurs, l'hexapeptide contenant le phosphate est fortement basique. La basicité donnée par la lysine et l'arginine de ce peptide n'est pas neutralisée par les acides aminés acidiques.

PHOSPHORYLASE PHOSPHATASE (PR-enzyme)

On a déjà signalé que sous l'influence de cette enzyme la phosphorylase a du muscle est transformée en forme b. Le nom de cette enzyme a subi des transformations depuis 1945 jusqu'à cette date. En 1945, Cori et Cori ont cru que l'action de cette enzyme consiste à enlever l'AMP à partir de la phosphorylase a. A cette époque, on croyait que l'AMP est le groupe prosthétique de la phosphorylase a. Pour cette raison, cette enzyme a été appelée "prosthétique group-removing enzyme" ou la PR-enzyme. Mais la présence d'AMP dans la molécule de la phosphorylase a n'a pu être prouvée tandis que Keller et Cori (1953) ont observé que la transformation de la phosphorylase a en forme b sous l'influence de la PR enzyme est réalisée par une déphosphorylation et par la division simultanée de cette molécule en deux parties égales. Ces auteurs ont alors nommé cette enzyme "Phosphorylase-rupturing-enzyme" ; le nom abrégé reste identique.

Finalement, Krebs et ses collaborateurs (1959), en remarquant son activité essentiellement phosphatasique, l'ont nommée "Phosphorylase-phosphatase".

La phosphorylase-phosphatase du foie et du cœur est capable de déphosphoryler la phosphorylase active du foie, mais dans ce cas, le poids moléculaire de la phosphorylase reste inchangé (Wosilait et Sutherland 1956).

La phosphorylase a du muscle de la langoustine est aussi déphosphorylée par la phosphorylase-phosphatase du muscle de langoustine et de lapin. Mais cette phosphorylase déphosphorylée ne subit aucune diminution de poids moléculaire (Cowgill 1959 b).

B. INHIBITEURS DE LA PHOSPHORYLASE

GLUCOSE

Le glucose agit comme un inhibiteur compétitif de la phosphorylase du muscle. Cette inhibition est complètement réversible par une augmentation de la concentration d'AMP (Cori et Cori 1940 ; Cori, Cori, et Green 1943 ; Shapiro et Wertheimer 1943).

Le fructose, le mannose, le maltose et le glucose-6-phosphate n'ont aucune action inhibitrice sur la phosphorylase (Cori et Cori, 1940).

CAFEINE

Kihlman et Cvegaard-Hansen (1955) ont remarqué que la phosphorylase du muscle est presque complètement inhibée par la caféine à la concentration de 0,01 M. Mais l'effet inhibiteur de la caféine diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration du glucose-1-phosphate. Ceci indique que la caféine peut être un inhibiteur compétitif. Les mêmes auteurs ont remarqué que cette inhibition est réversible par une petite quantité de 5'-AMP. Un effet antagoniste est obtenu même avec 10^{-6} M de 5'-AMP, et l'inhibition est complètement réversible par 10^{-4} M d'AMP. Un léger antagonisme est obtenu avec le 3'-AMP ou avec l'adénosine à une concentration égale à celle de la caféine. L'acide adénosine diphosphate (ADP) est capable de s'opposer jusqu'à 60 % de l'inhibition.

Parmi les autres dérivés puriques, le 8-éther et les 8-thioéthers de la caféine sont les inhibiteurs les plus puissants. L'action inhibitrice de l'éthoxycaféine est deux fois plus forte que la caféine elle-même. L'éthoxycaféine à la concentration de 10^{-3} M et de 5×10^{-3} M inhibe complètement l'activité phosphorylasique du muscle. Parmi les autres dérivés puriques étudiés, l'adénine, la théophylline, la 1-éthylthéobromine, la 8-hydroxy-9-méthyl-8,9-dihydrocaféine (HMDC), l'acide, 1,3,7,9-tétraméthylurique et les autres dérivés tétraméthyl d'acide urique sont moins efficaces que la caféine. L'inhibition avec tous ces dérivés puriques est réversible par une simple dialyse pendant 3 heures à 5°C. Ce phénomène indique que la molécule de la phosphorylase a n'est pas modifiée par la caféine.

En somme, les oxypurines méthylées sont les inhibiteurs compétitifs de la phosphorylase du muscle. Cette inhibition est réversible par la dialyse ou par l'AMP.

La phosphorylase d'origine végétale n'est pas inhibée par la caféine (Kihlman et Cvegaard-Hansen 1955).

EFFET DU PARACHLOROMERCURIBENZOATE (PCMB)

Le parachloromercuribenzoate (PCMB) agit comme inhibiteur des enzymes qui ont besoin de groupes -SH pour leur activité. Madsen et Cori, en 1956, ont étudié le problème de l'interaction de la phosphorylase du muscle avec le PCMB. Ils ont remarqué que la phosphorylase cristallisée du muscle est complètement inhibée au bout de 90 minutes lorsqu'elle est préincubée avec le PCMB dans un tampon versène-glycerophosphate à pH 6,8.

La cinétique de la réaction de PCMB avec la phosphorylase a été mesurée par deux méthodes : spectrophotométrique et enzymatique. La combinaison de PCMB avec les groupes sulfhydrilés se produit plus vite que l'inhibition de l'activité enzymatique. De 17 à 18 groupes -SH de l'enzyme ont été titrés par cette méthode.

Effet sur le poids moléculaire : Au cours de cette étude d'inhibition Madsen Cori (1956) ont remarqué l'apparition d'une forme moléculaire ayant une constante de sédimentation inférieure à celle de la phosphorylase a. L'unité de Svedberg (S_{20w}) de cette espèce est de 5,6 tandis que la S_{20w} de la phosphorylase a est de 13,2 et celle de la phosphorylase b de 8,2.

Le poids moléculaire de la phosphorylase après inhibition par le PCMB a été calculé à 135.000 d'après les constantes de sédimentation et de diffusion. Cette valeur est supérieure seulement de 8 % au quart de poids moléculaire de la phosphorylase (125.000). Cet écart est probablement dû à la valeur moyenne calculée après la réaction. Il est probable qu'une partie de la phosphorylase ne soit totalement désintégrée.

Selon ces auteurs ce résultat est considéré comme la preuve qu'à la suite de l'action du PCMB sur la phosphorylase, la protéine est dissociée en quatre sous-unités de poids moléculaire égales (Monomère phosphorylasique).

Madsen et Gurd (1956) ont remarqué que les quatre sous-unités produites par le PCMB, sont capables de se réassembler et de reconstituer la phosphorylase a sous l'influence de la cystéine. La phosphorylase a, reconstituée à partir de 4 sous-unités par la cystéine, est catalytiquement active.

La phosphorylase phosphatase est capable de déphosphoryler les formes monomères de la phosphorylase. La dissociation par le PCMB signale aussi la liaison sulfhydrilée entre les 4 monomères phosphorylasiques.

Le nitrate de méthylmercurique inhibe complétement la phosphorylase d'une manière analogue à celle du PCMB. L'iodoacétamide (3×10^{-3} M) inhibe seulement 10% de l'activité de la phosphorylase a ($1,3 \times 10^{-6}$ M) pour une incubation d'une heure à pH 6,8.

SULFATE D'AMMONIUM

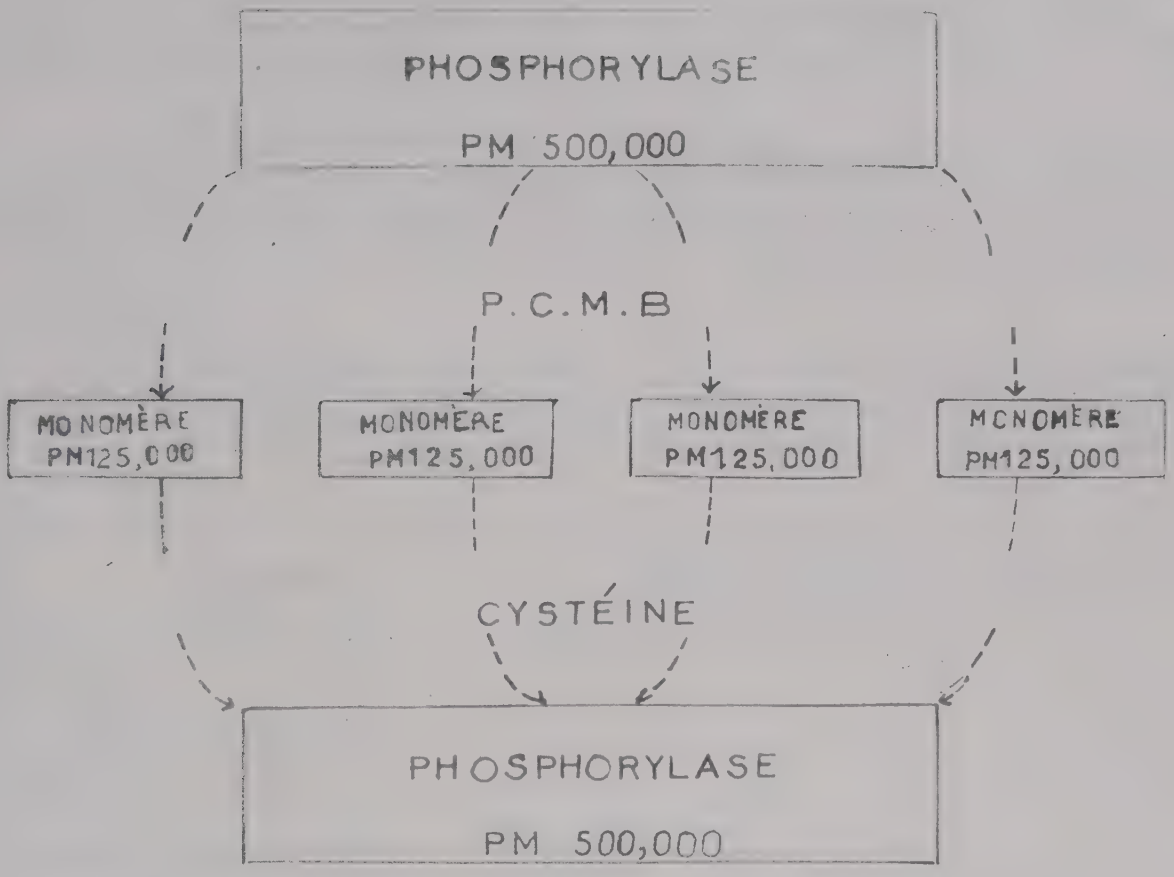
Le sulfate d'ammonium est un inhibiteur non-compétitif de la phosphorylase. Cette inhibition est réversible par l'addition d'AMP dans le milieu d'incubation (Cori, Cori et Green 1943)

PHLORIZINE

La phlorizine est aussi un inhibiteur non-compétitif de la phosphorylase. Deux molécules de ce réactif réagissent avec une molécule de l'enzyme. Cette action inhibitrice est réversible par l'addition d'AMP (Cori, Cori et Green 1943)

GLYCEROPHOSPHATE DE SODIUM

C'est un inhibiteur compétitif (Cori, Cori et Green 1943).



EFFET DU PCMB ET DE LA CYSTEINE SUR
LA MOLECULE DE LA PHOSPHORYLASE

FIGURE 10

EFFET DU SALICYLATE

Segal et Blair (1959) ont étudié l'action de salicylate sur la phosphorylase du muscle. Le salicylate à 30 mg pour cent n'a aucun effet sur la phosphorylase a cristallisée du muscle. Mais il est capable de réduire l'activité phosphorylasique dans le diaphragme du rat. Au bout de 15 minutes d'incubation du diaphragme, en présence de salicylate, l'inhibition de la phosphorylase (forme active) est de 70% et peut augmenter jusqu'à 87%.

L'activité phosphorylasique totale (forme a et forme b) est aussi réduite par le salicylate mais l'inactivation dans ce cas est lente. Le taux de la phosphorylase a, par rapport à la phosphorylase totale, est de 36 à 50%. Ce taux est réduit à 10% par l'incubation en présence du salicylate pendant une heure.

Le dinitrophénol montre une action identique sur la phosphorylase du muscle. Par contre le p-hydroxybenzoate n'a aucune action inhibitrice sur l'activité de cette enzyme. Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Expérience	ENZYME ACTIVE µM P/mg protéine	ENZYME TOTALE
Témoin	8,1	18,2
Salicylate 30 mg %	1,3	11,6
Témoin	4,8	14,6
Dinitrophénol 2 mg %	0,5	5,3
Témoin	9,3	18,5
p-Hydroxybenzoate 30 mg %	11,0	22,4

Tableau IV

Inhibition par le salicylate et d'autres inhibiteurs

D'après ces résultats les auteurs concluent que lors de cette perte d'activité phosphorylasique il s'agit sans doute d'un effet secondaire sur un ou plusieurs des facteurs nécessaires au maintien des formes a et b de la phosphorylase du muscle.

EFFET DE LA SALMINE

Krebs (1954) a observé que la phosphorylase a cristallisée du muscle, en présence et en absence d'acide adénylique, est inhibée par des quantités de salmine de l'ordre du microgramme et que cette inhibition est réversible en présence d'insuline. Quand on augmente la concentration de salmine, on obtient pour la phosphorylase a, une courbe d'activité diphasique typique, c'est-à-dire que l'inhibition est progressivement diminuée avec l'augmentation de la concentration de salmine.

Cet auteur a également étudié l'effet de cette protéine basique sur la phosphorylase b du muscle. Il a remarqué que l'affinité de la phosphorylase b (résultante de l'action de la PR-enzyme sur la phosphorylase a) pour l'acide adénylique et pour l'acide inosinique est nettement augmentée par la présence de la salmine. Krebs a remarqué que ni la lysine libre ni l'arginine libre ne sont capables de reproduire cette action, tandis que la polylysine synthétique (P.M. 4,000) a un effet semblable à celui de la salmine. Selon cet auteur, l'action de la salmine est donc due à la lysine constituante de la molécule de cette protéine basique.

La phosphorylase b produite par l'action de la trypsine n'est pas influencée par la salmine, ce qui montre que cette forme b est différente de celle qui résulte de l'action de la PR-enzyme (Krebs 1954).

Au cours de la même année Madsen et Cori (1954) ont remarqué que la phosphorylase a cristallisée, mise en solution est précipitée par la protamine à 0°C. Ce précipité est insoluble à 0°C, mais devient de plus en plus soluble avec l'augmentation de la température. Le précipité produit par l'interaction de la phosphorylase et de la protamine conserve l'activité enzymatique de la phosphorylase. Cette activité enzymatique diminue progressivement avec l'augmentation de la proportion de la protamine. L'activité diphasique de la phosphorylase a en présence de la salmine peut être expliqué par le graphique diphasique de la précipitation de la phosphorylase et de la protamine et par la variation de l'activité enzymatique de ces complexes (Madsen et Cori 1954).

EFFET D'IONS DE METAUX LOURDS

La phosphorylase du foie est complètement inhibée par l'addition d'ions de métaux lourds dans le milieu d'incubation. Hg^{++} (10^{-6} M), Ag^{++} (10^{-5} M) ou Cu^{++} (10^{-3} M) inhibent complètement l'activité de la phosphorylase. D'après ces données on peut croire que cette enzyme est activée par les "metal-binding agents". Mais, en effet, aucune activation n'a été observée (Sutherland et Wosilait 1956).

C. ACTIVATEURS DE LA PHOSPHORYLASE

AGENTS REDUCTEURS

Cori et Cori (1940) ont remarqué que les agents réducteurs tels que la cysteine, le glutathion et le cyanure réagissent comme activateurs de la phosphorylase. En 1943, Green et Cori ont constaté que la cystéine active la phosphorylase en augmentant la solubilité de la protéine. Le glutathion et le cyanure de potassium sont moins efficaces.

Cette augmentation, sous l'influence des composés du groupe sulfhydrilé paraît étonnante lorsqu'on considère la basse concentration de la cystine dans la molécule de la phosphorylase. Le soufre existe seulement sous forme de SH dans la protéine (Velick et Wicks 1951).

La cystéine et d'autres agents réducteurs n'ont aucune action activatrice sur la phosphorylase du foie (Sutherland et Wosilait 1956).

ACTIVATION PAR ADENOSINE-5-PHOSPHATE

Cori et ses collaborateurs, depuis le début de leurs recherches sur l'activité phosphorylasique, ont remarqué que la phosphorylase a besoin de l'acide adénosine monophosphate (AMP) pour son activité. Ils ont constaté que la phosphorylase a du muscle, en absence de 5'-AMP, a une activité de 65 à 70%, tandis qu'en présence de $1,5 \times 10^{-6}$ M AMP l'activité atteint son maximum. Le 3'-AMP est incapable d'activer la phosphorylase du muscle. L'acide inosinique (5'-IMP) active la phosphorylase a du muscle légèrement à une concentration élevée. Les autres nucléotides tels que la cytidine monophosphate (5'-CMP), l'uridine monophosphate (5'-UMP) et le guanosine monophosphate (5'-GMP) sont incapables d'augmenter l'activité de la phosphorylase a du muscle.

Sutherland et Wosilait (1956), pour la phosphorylase du foie, constatent une augmentation entre 15 et 40% de l'activité par le 5'-AMP.

Hadjiolov et Dancheva (1958) ont remarqué une activation par l'AMP variable selon la préparation de la phosphorylase du foie. Selon ces auteurs l'activation par l'AMP varie entre 35 et 100%. Ils ont remarqué que la phosphorylase hépatique est activée non seulement par le 5'-AMP, mais aussi par les 5'-GMP, 5'-UMP, et 5'-CMP. L'activation par ces nucléotides est de 20 p. 100 (plus basse qu'avec le 5'-AMP).

La phosphorylase b du muscle est activée en présence de 5'-AMP. Cette activité atteint son maximum en présence de 5×10^{-5} M AMP (Green, Cori et Cori 1943). Mais cette activation est un phénomène indépendant de la transformation de la forme b de la phosphorylase en forme a (Krebs et Coll 1958).

La phosphorylase inactive du foie (inactive -LP) n'est pas activée par l'AMP, à l'inverse de ce qui se passe dans le muscle (Sutherland et Cori 1951).

EFFET D'IONS SUR LA PHOSPHORYLASE

Deane, Nesbett, Buchanon et Hastings (1947) ont remarqué que la synthèse du glycogène, à partir du glucose ou du pyruvate, dans la tranche de foie, est nettement augmentée en présence d'ions de potassium. Par contre, la prédominance d'ions de sodium dans le milieu d'incubation défavorise la synthèse du glycogène.

Cahill, Ashmore, Zottu et Hastings (1957) ont récemment pu mettre en rapport la présence prédominante d'ions Na^+ avec une augmentation du taux de la phosphorylase. Selon ces auteurs, l'équilibre dynamique du système phosphorylasique est déplacé vers un taux élevé de la phosphorylase active en présence d'ions Na^+. Cette activation est la cause de la glycogénolyse dans les tranches du foie. Par contre, les ions K^+, par la diminution du taux de la phosphorylase active du foie, favorisent la glycolyse dans le foie.

L'effet analogue à celui des ions Na^+ est provoqué par les ions Ca^{++} et Mg^{++} (De Duve et Berthet 1957).

Chapitre VII

A. EFFET DES HORMONES SUR LA PHOSPHORYLASE

EFFET DE L'ADRENALINE ET DU GLUCAGON

Dès leurs premières recherches, Sutherland et Cori (1951) et Sutherland (1952) ont établi que les agents glycogénolytiques agissent exclusivement sur le processus de phosphorylation et sont sans effet sur le système amylasique.

Sutherland et Cori (1951) ont pu préciser que la réaction phosphorylasique constitue l'étape limitante de la glycogénolyse et qu'elle est le siège de l'action des agents glycogénolytiques. Ils ont pu montrer en outre que ceux-ci induisent, tant in vitro qu'in vivo une augmentation de la teneur en phosphorylase active du tissu hépatique. La phosphoglucomutase, l'enzyme qui transforme le glucose-6-phosphate en le glucose-1-phosphate , l'enzyme qui hydrolyse le glucose-6-phosphate en glucose et phosphate libre ne sont pas influencées (De Duve et Berthet 1957).

Dans les tissus, le taux de la phosphorylase active est la résultante de l'action des deux systèmes antagonistes : la phosphorylase phosphatase et la phosphorylase kinase (voir le chapitre sur "le co-enzyme de la phosphorylase"). L'activité de ces enzymes dans la cellule intacte est témoingée par la vitesse à laquelle le phosphate marqué est incorporé à la phosphorylase. Dans les coupes de foie, l'adrénaline et le glucagon déplacent l'équilibre vers un taux plus élevé de phosphorylase active.

Dans le muscle, l'adrénaline provoque une augmentation du taux de phosphorylase active mais le glucagon est incapable d'augmenter le taux de la phosphorylase active (Sutherland 1951 a, 1952 ; Cori et Illingworth 1956).

Au cours des recherches antérieures, ni Sutherland (1952), ni De Duve (1953-1954) n'avaient pu démontrer l'effet de l'adrénaline ou du glucagon sur des homogénats du foie. Une structure cellulaire intacte semblait nécessaire à l'action de ces agents. Cependant, grâce aux travaux de Sutherland et ses collaborateurs, on a trouvé les conditions où un système dépourvu de cellules réagit au glucagon et l'adrénaline par une production accrue de phosphorylase. Ces auteurs ont observé que le phosphate marqué est rapidement incorporé à la phosphorylase du foie et que cette incorporation est considérablement augmentée sous l'influence de l'adrénaline et du glucagon (Rall, Sutherland et Wosilait 1956).

Rall, Sutherland et Berthet (1957) ont remarqué que l'activation par l'adrénaline et par le glucagon comprend deux étapes. La première étape consiste en une formation d'un facteur actif, d'un nucléotide encore à identifier dans la fraction particulière en présence d'hormones sympathomimétiques. La seconde étape correspond en une stimulation de la formation de phosphorylase dans la fraction surnageante sur laquelle les hormones n'ont aucune action.

La formation d'un facteur identique en présence de l'adrénaline, a été aussi admise au niveau du myocarde et du muscle de chien.

3,5 CYCLO-ADENOSINE MONOPHOSPHATE

Les recherches ultérieures de Sutherland et Rall (1957) ont pu préciser la nature de ce nucléotide. Ils ont trouvé que ce nucléotide isolé par chromatographie est identique à un nucléotide isolé par Cook, Lipkin et Markham (1957), dans le produit de dégradation de l'ATP par l'hydroxide de baryum. Ce nucléotide a été appelé, par ces derniers auteurs, acide cyclo-dianhydro-adénylique. De plus, ils ont tenté d'établir une formule pour ce nucléotide.

D'après la formule, les deux molécules d'AMP sont attachées par l'intermédiaire de deux molécules de phosphates sur les carbones 3 et 5 du ribose, formant ainsi une structure cyclique.

Le nucléotide a été isolé par les moyens suivants : a) par chromatographie sur papier, b) par son activité biologique, c) par le spectre ultraviolet, d) par la perte de l'activité biologique par une enzyme partiellement purifiée du myocarde, e) par sa conversion en adénosine sous l'incubation prolongée avec le venin de Crotalus adamanteous. Il a été trouvé identique au nucléotide fabriqué artificiellement par Cook, Lipkin et Markham.

Ce cyclo 3,5-AMP a été trouvé résistant à l'attaque des monoestérases. Il est assez stable aux acides et aux bases (Cook, Lipkin et Markham 1957; Sutherland et Rall 1957).

L'activité biologique de ce nucléotide est détruite par l'incubation avec un extrait brut ou partiellement purifié du coeur et du cerveau. En présence d'une enzyme partiellement purifiée du coeur, ce nucléotide est converti quantitativement en 5'-AMP.

L'activité biologique n'est pas détruite par l'incubation avec la ribonucléase du pancréas ou par la phosphodiestérase de la rate (Sutherland et Rall 1957). Ce nucléotide est déphosphorylé par le venin de Crotalus adamanteous (Sutherland et Rall 1957; Cook, Lipkin et Markham 1957).

Rall et Sutherland (1958) ont observé que le cyclo 3,5-AMP est protégé par la caféine. Le fluorure de sodium dans le milieu augmente la teneur de 3,5-AMP. Selon ces auteurs, la formation du nucléotide cyclique le serait par la cyclisation de l'ATP ; peut-être le reste ribonucléotide du polynucléotide (RNA) endogène ne joue aucun rôle dans cette formation.

Une quantité considérable de ce nucléotide est formée, sous l'influence de l'adrénaline, dans le coeur, dans le cerveau et dans le muscle squelettique du chien.

Le glucagon est incapable de stimuler la formation de ce nucléotide cyclique au niveau du muscle squelettique (Rall et Sutherland 1958).

En résumant, l'adrénaline et le glucagon (pour le foie seulement) stimulent la formation du cyclo 3,5-AMP et le cyclo AMP à son tour stimule la formation de la phosphorylase active.

Parmi toutes les amines sympathomimétiques, l'activation de la phosphorylase est maximale par l'adrénaline.

Cette activation de la phosphorylase du foie in vivo par le glucagon et par l'adrénaline (Sutherland 1956), et de la phosphorylase du muscle in vivo par l'adrénaline (Cori 1956) Illingworth et Cori 1956) a été également constatée.

L'ergotamine est capable de bloquer l'action de l'adrénaline (Sutherland et Rall 1957).

Cornblath (1955 et 1957) a également observé que l'activité phosphorylasique dans les tranches de foie est augmentée par des concentrations croissantes d'adrénaline ou de glucagon, jusqu'à ce qu'un effet optimal ait été atteint. A la concentration sub-maximale, la présence simultanée de l'éphédrine et du glucagon a un effet cumulatif ; dans cette expérience, en présence du glucagon seul, l'activité est de 0,76, et en présence de l'éphédrine seule, l'activité est de 1,00 ; en présence de l'éphédrine et du glucagon ensemble, l'activité est de 1,87, tandis que le glucagon et l'adrénaline ou l'éphédrine et l'adrénaline ensemble ne montrent aucune activation potentialisatrice. L'auteur a émis une hypothèse sur la différence du mécanisme d'activation de la phosphorylase du foie par le glucagon et par l'adrénaline. A l'appui de cette hypothèse, il a signalé le fait que la dihydroergotamine inhibe l'action de l'adrénaline mais non du glucagon.

EFFET DE LA CORTISONE

Kerppola (1952) a constaté que l'injection de cortisone inhibe considérablement la phosphorylase du muscle et du foie de lapin. L'administration de la cortisone augmente la charge glycogénique des organes.

Cet auteur conclut que l'inhibition de la phosphorylase par la cortisone empêche la glycogénolyse dans les organes. Cette inhibition a été trouvée réversible par l'administration de l'adrénaline.

A l'inverse de ces résultats, Léonard (1957) ne trouve aucune inhibition de la phosphorylase du muscle de rat par la cortisone. Cet auteur a constaté aussi l'augmentation du glycogène dans les organes par l'administration de la cortisone. Selon cet auteur, lorsque la cortisone et l'adrénaline sont administrées ensemble, l'effet de l'adrénaline (activation de la phosphorylase) prédomine sur l'action de la cortisone dans les organes. L'auteur n'a pu trouver un rapport direct entre la concentration du glycogène et de l'activité phosphorylasique dans le muscle.

Hess, Shaffran et Everitt (1960) ont remarqué que la cortisone à des doses 1,25 mg et 2,50 mg par 100 g de poids d'animal provoque une activation faible de la phosphorylase hépatique tandis qu'une dose de 5,0 mg par 100 g de poids d'animal active la phosphorylase considérablement.

EFFET DE L'A.C.T.H. (hormone adrénocorticotrope)

Haynes et Berthet (1957) ont remarqué que dans les surrénales, l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), au cours de la synthèse des corticostéroïdes, active spécifiquement la phosphorylase. Cette activation se ferait par une accumulation du cyclo 3,5-AMP dans les tranches de surrénales, et ce nucléotide augmente le taux de la phosphorylase active. L'activité phosphorylasique est également augmentée lorsque le 3,5-AMP est ajouté au milieu d'incubation de la tranche de la surrénale (Haynes 1958). Il paraît donc que le mécanisme d'activation est semblable à ce qu'on trouve dans le foie sous l'influence de l'adrénaline ou du glucagon. Mais l'ACTH est incapable d'agumenter l'activité de la phosphorylase du foie (Haynes 1958).

Pour Emberland (1960) l'hormone corticotrope in vitro n'augmente pas le taux de la phosphorylase active.

EFFET DE L'OESTROGENE ET DE LA PROGESTERONE

Le taux de glycogène est augmenté dans l'utérus par l'administration de l'oestrogène. Herbener et Atkinson (1959) ont entrepris une étude pour démontrer l'action de l'oestrogène et de la progestérone sur l'activité phosphorylasique dans l'utérus du rat. Mais les auteurs n'ont pu démontrer aucune activation significative de la phosphorylase par l'administration de l'oestrogène en présence ou en l'absence de la progestérone. La castration des animaux n'a pu modifier cette activité. Par contre Léonard (1958) a constaté une augmentation de la phosphorylase (a) (forme active) de l'utérus, par l'administration d'une seule dose d'oestrogène (50 µg) chez les rattes castrées. Cette augmentation s'établit en deux étapes. La première étape consiste en une augmentation de la phosphorylase a après 6 heures d'administration de l'hormone. La deuxième étape consiste en une augmentation subséquente de la phosphorylase totale (forme a + forme b) après 24 heures d'administration.

La restostérone a une action semblable à celle de l'oestrogène, mais beaucoup moins prononcée.

La progestérone n'a pas d'effet sur la phosphorylase de l'utérus du rat.

EFFET DE LA SEROTONINE

Mansour (1959) a étudié l'effet de la sérotonine et de l'adrénaline sur l'activité phosphorylasique de la douve de foie, Fasciola hepatica. Il a constaté une activation de la phosphorylase sous l'influence de la sérotonine. Il a alors conclu que pour la douve de foie la sérotonine joue le même rôle que l'adrénaline pour les organes de mammifères.

Mansour et ses collaborateurs (1960) ont également trouvé que 3,5'-AMP cyclique est formé par le tissu de la douve de foie sous l'influence de la sérotonine.

Pour Colombo et ses collaborateurs (1960) la sérotonine n'a qu'une action indirecte sur la phosphorylase hépatique. Cette action activatrice n'est pas remarquée chez les animaux surrénalectomisés.

Leonard et Day (1960) ont recherché l'action de la sérotonine sur la phosphorylase musculaire. Selon ces auteurs, la phosphorylase du muscle utérin (muscle lisse) diminue tandis que la phosphorylase du muscle strié et du myocarde reste inchangée sous l'influence de la sérotonine.

Tableau V

	Adrénaline	Glucagon	ACTH	Sérotonine
Foie	+	+	-	-
Muscle	+	-	-	-
Surrénale	-	-	+	-
Douve de foie	-	-	-	+

+ : L'activation de la phosphorylase

- : Aucune action sur la phosphorylase

B. LA PHOSPHORYLASE ET LA GLYCOGENESE

L'action glycogénolytique du glucagon et de l'adrénaline est entièrement explicable par l'activation de la phosphorylase. On a déjà remarqué que la réaction phosphorylasique in vitro est aisément réversible. On devrait donc s'attendre à ce qu'une activation de l'enzyme augmente la vitesse de la réaction sans en modifier le sens. Or il n'en est rien; le glucagon et l'adrénaline provoquent la glycogénolyse, mais jamais la synthèse du glycogène. Le même phénomène est observé au niveau du muscle, qui contient un système phosphorylasique analogue à celui du foie. L'adrénaline (mais non le glucagon) y provoque en même temps une augmentation du taux de phosphorylase active et une stimulation de la glycogénolyse, cette dernière apparaissant même dans des conditions par ailleurs favorables à une synthèse du glycogène (voir revue De Duve et Berthet 1957).

Les divers auteurs ont recherché en vain le facteur responsable de l'irréversibilité de l'action des agents glycogénolytiques. Le déplacement de l'équilibre de la réaction phosphorylasique par une modification du rapport phosphate inorganique/glucose-1-phosphate ou du degré de ramification du glycogène, n'a pu apporter aucune indication sur ce facteur irréversible.

Les données accumulées par Hastings et ses collaborateurs indiquent d'une manière nette l'existence d'une relation directe entre la teneur du foie en phosphorylase active et la vitesse de la glycogénolyse. Ils ont remarqué que la présence des ions Na^+ exerce un effet défavorable sur la synthèse du glycogène, tandis que les ions k^+ favorisent la synthèse du glycogène (Deane, Nesbett, Buchanon, et Hastings 1947). Ils ont en même temps remarqué qu'une concentration élevée des ions Na^+ dans le milieu d'incubation résulte de l'augmentation de la teneur de la phosphorylase active qui, à son tour, est responsable de la glycogénolyse (Cahill, Ashmore, Zottu, Hastings 1957).

Niemeyer (1955) et Beloff-Chain et ses collaborateurs (1955) sont les premiers à émettre une hypothèse selon laquelle la synthèse du glycogène est réalisée par un système enzymatique indépendant de la phosphorylase.

Les conditions qui règnent à l'intérieur de la cellule hépatique (concentration en phosphate et en hexose phosphates) et de nombreux autres arguments, plaident en faveur de cette hypothèse. Cahill et ses collaborateurs (1957) aussi, sont arrivés à la même conclusion par leurs études de l'effet des ions sur la synthèse du glycogène.

De Duve et Berthet (1957) pensent que l'hypothèse la plus simple qui puisse rendre compte de la corrélation étroite entre l'activité phosphorylasique et l'intensité de la glycogénolyse dans le foie (et peut-être aussi dans d'autres tissus tels que le muscle), est de supposer que la phosphorylase

intervient uniquement dans la dégradation du glycogène. La synthèse de ce dernier serait l'oeuvre d'un système distinct qui reste encore à découvrir.

En effet, au cours de la même année, Leloir et Cardini (1957) ont découvert dans le foie un système enzymatique de la synthèse du glycogène à partir d'uridine diphosphate-glucose (U D P G). Ce système enzymatique distinct de la phosphorylase a été trouvé dans le muscle aussi par Vilar-Palasi et Larner (1958). Cette enzyme synthétise le glycogène selon la réaction suivante :

$$UDPG + Primer \longrightarrow UDP + glucosyl\ \alpha\ (1 \longrightarrow 4)\ primer$$

La réversibilité de l'activité de cette enzyme (la dégradation du glycogène) n'a pas été prouvée (Leloir, Clavarria, Coldemberg et Carminatti 1959). Hauk et Brown (1959) ont pu isoler cette enzyme à partir du muscle du lapin. Ils ont aussi constaté que l'action de cette enzyme est spécifique et irréversible.

Hauk, Illingworth, Brown et Cori (1959) ont étudié l'activité de cette enzyme de la synthèse du glycogène dans divers types de maladies de glycogénose. Mais ces auteurs n'ont pu constater aucune augmentation de son activité. Par contre, Mommaerts et ses collaborateurs (1959) Larner et Villar Palasi (1959) et Schmid et ses collaborateurs ont trouvé une sorte de glycogénose en l'absence d'une activité phosphorylasique ; l'uridinedi-phospho-glucose-glycogène transférase, dans ces cas, reste inchangée. D'après ces résultats, ces auteurs sont arrivés à la conclusion que dans les conditions physiologiques la phosphorylase devait réagir dans le sens de la dégradation et non vers la synthèse du glycogène.

Cependant, il faut signaler que la découverte de ce chemin alternatif de la synthèse du glycogène n'a pu leur apporter des preuves définitives en faveur de leurs propres arguments. L'accélération de la glycogénèse sous l'influence de l'insuline et des agents antidiabétiques n'a pas pu être expliquée par l'activation de la transférase de la synthèse du glycogène.

Chapitre VIII

A. PHOSPHORYLASE D'ORGANES PARTICULIERS

FOIE

La phosphorylase de cet organe (LP) a fait l'objet de plusieurs études de Sutherland et de ses collaborateurs et de plusieurs autres auteurs. Ses propriétés ont été signalées dans les divers chapitres sur l'activité phosphorylasique en général. Seulement les points distinctifs seront soulignés ici. Le poids moléculaire de cette phosphorylase est de 260,000 (S_{20w} = 8,4).

La phosphorylase inactive du foie (inactive LP) est formée par la perte de phosphate par une enzyme (IE) semblable à celui du muscle. Les différences entre la forme du muscle (phosphorylase b) et du foie (inactive LP) sont les suivantes : inactive

a) La forme inactive LP a le même poids moléculaire que la forme active (LP), tandis que la phosphorylase b a un poids moléculaire moitié moindre de la forme active (phosphorylase a).

La forme inactive (inactive-LP) n'est pas activée par l'AMP à l'inverse de ce qui se passe dans le muscle. Le seul moyen de l'activer est par la transformation en forme active sous l'influence de la phosphorylase kinase (Wosilait et Sutherland 1956).

La phosphorylase du foie (LP) est très soluble dans l'eau en présence et en absence des différents sels (Sutherland et Wosilait 1956).

Pour Sutherland et Wosilait (1956) l'AMP et l'Inosine-5-phosphate (IMP) augmentent l'activité phosphorylasique du foie de 15 à 40 pour cent. Pour Hadjiolov et Dancheva (1958) la phosphorylase du foie est activée davantage par l'AMP (de 20 à 100%). De plus, cette phosphorylase est aussi activée par l'uridine-5-phosphate (UMP), par la cytidine-5-phosphate (CMP) et par la guanosine-5-phosphate (GMP).

La cystéine et le glutathion sont incapables d'augmenter l'activité de LP. Mais l'inhibition par le p-chloromercuribenzoate est réversible par ces deux agents réducteurs. La phosphorylase du foie est inhibée par des ions de métaux lourds. L'adrénaline et le glucagon augmentent le taux de la phosphorylase active dans le foie par l'incorporation de phosphates dans la molécule de LP (le glucagon n'a aucun effet sur la phosphorylase du muscle). Elle n'est pas activée par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH).

UTERUS

L'activité phosphorylasique dans l'utérus humain a été étudiée par Brody (1958) et l'utérus du rat a fait l'objet d'études de Léonard (1958) et de Herbener et Alkinson (1959).

Brody (1958) a observé que la phosphorylase du myomètre a besoin du glycogène pour son activité. Il a constaté que la phosphorylase dans le myomètre humain existe exclusivement sous la forme active. L'addition de l'AMP dans le milieu d'incubation peut activer seulement la phosphorylase a.

Cet auteur n'a pas recherché l'existence de la phosphorylase-kinase ou de la phosphorylase-phosphatase.

Dans le cycle menstruel, l'activité est minima pendant le dioestrus. L'activité de la phosphorylase augmente considérablement pendant la grossesse et retombe après la parturition. L'activité pendant la période post-ménopausique est nulle ou négligeable.

TISSUS ADIPEUX

Graisse jaune

Creasey et Cray (1951) ont étudié l'activité des enzymes concernant la synthèse du glycogène dans la graisse jaune du rat.

Ils ont constaté la présence de la phosphorylase et du facteur "branchant" dans ce tissu. Ils n'ont pu démontrer avec assurance la forme prédominante de la phosphorylase puisque la préparation enzymatique peut être contaminée par une concentration sous-optimale d'AMP.

Les auteurs ont trouvé le FR-enzyme dans cet organe. Ils ont constaté que la phosphorylase de ce tissu est considérablement activée en présence d'AMP (0,001 M).

Graisse blanche

Mirsky (1942) a constaté la présence de la phosphorylase dans la graisse blanche, Vaughan, Steinberg et Shapier (1959 et 1960) ont étudié l'effet de l'adrénaline, du glucagon et d'A.C.T.H. sur la phosphorylase de ce tissu.

LEUCOCYTES

Wagner (1950), pour la première fois, a constaté que la dégradation du glycogène dans les leucocytes polynucléaires n'est pas due à l'activité amylasique. La dégradation est catalysée par la phosphorylase. La vitesse de la dégradation due à l'activité phosphorylasique augmente proportionnellement avec la concentration croissante d'ions phosphates dans le milieu d'incubation. Selon cet auteur, l'adénosine-5-phosphate constitue un activateur essentiel pour la réaction. Aucune activité n'a pu être décelée dans la suspension des leucocytes.

Par contre, Rohdewald (1952) a constaté que la phosphorylase peut être démontrée dans la suspension des leucocytes du cheval.

EMBRYONS

Nemeth, Insull et Flexener (1954) ont étudié l'activité phosphorylasique du foie embryonnaire de cobaye.

Dans le foie d'embryon de cobaye, le glycogène ne peut pas être décelé avant le 57e jour, (la période de gestation étant de 66 jours). Mais ils ont pu obtenir une activité par rapport à la phosphoglucomutase, semblable à celui des adultes, à partir du 35e jour.

Selon ces auteurs, l'absence de la synthèse du glucogène avant le 57e jour, est due à un poids moléculaire bas du "primer" présent. Ils envisagent également l'absence d'enzyme "branchant" avant le 57ème jour.

LA PHOSPHORYLASE DU MUSCLE DE LA LANGOUSTINE

Chez les invertébrés, le muscle de la langoustine a fait l'objet d'études phosphorylasiques, Cowgill et Cori (1955) ont observé que la phosphorylase de cet organe devient active selon l'ordre suivant :

Phosphorylase inactive ⟶ Phosphorylase b ⟶ Phosphorylase a

Ce processus de transformation est accéléré par la température, par l'AMP, par le fluorure et par une variété de substances. Le versène (EDTA) a une action inhibitrice sur ce système.

Cowgill et Cori (1955) ont constaté que la phosphorylase b du muscle du lapin est transformée en forme a par l'extrait du muscle de la langoustine.

En 1959, Cowgill a isolé les phosphorylases à partir du muscle de la langoustine. Il a trouvé l'existence des trois formes de la phosphorylase : la phosphorylase a qui est active même en l'absence d'AMP ; la phosphorylase b qui est activée par l'AMP, et la phosphorylase c qui est activée en présence d'une concentration élevée d'AMP (0,01 M).

Les différentes formes ont été les propriétés suivantes :

Phosphorylase a - Poids moléculaire mesuré par la constante Svedberg égale à ($S_{20\omega}$) à 9,0.

Aucune activation n'a été démontrée en présence d'AMP et de la cystéine. Cette enzyme est fortement inhibée par le P.C.M.B. (inhibition 100% par la concentration de 10^{-5} M) et cette inhibition n'était pas réversible par la cystéine. L'inhibition est faible en présence du glucose (25% par 0,25 M) et par le pyruvate (50% par 0,25 M).

La protamine, l'histone et la lysine (en concentrations échelonnées 1 et 2000 µg par cc) n'ont entraîné aucune inhibition.

Phosphorylase b - Cette forme a un poids moléculaire égal à la phosphorylase a. Elle a besoin de l'AMP pour son activité. Aucun autre nucléotide n'est capable de remplacer l'AMP.

Phosphorylase c - Cette forme de la phosphorylase n'a pu être isolée, mais son activité est décelée en présence de 0,02 M d'AMP. Cette activité disparaît par une simple congélation et réchauffement.

PRIMER - Le glycogène du foie de lapin, le glycogène du muscle de langoustine et l'amidon soluble servent également bien comme polysaccharide primer, pour la réaction phosphorylasique.

PHOSPHORYLASE KINASE DE LA LANGOUSTINE

Cette kinase a une activité maximale à pH 7,5 et elle est activée par la cystéine. Cette enzyme est inactive en l'absence d'ATP et d'ions Mn^{++}. La transformation de la forme b en forme a est accélérée en présence d'ATP et d'ions Mn^{++}.

L'inosine triphosphate (ITP), l'uridine triphosphate (UTP), la guanosine triphosphate (GMP) et le cytidine triphosphate sont incapables de remplacer l'ATP dans cette réaction. Le besoin d'ions Mn^{++} est aussi spécifique. Cet ion ne peut pas être remplacé par des ions Ca^{++}, Ba^{++}, Cd^{++} ou Pb^{++}. Des ions Mg^{++} sont capables d'activer cette enzyme à seulement 30% de l'activité en présence d'ions Mn^{++}.

TUMEURS

Les recherches sur l'activité phosphorylasique des tissus tumoraux signalent une variation extrême dans leur activité. Ces variations peuvent être dues à l'état des tissus tumoraux ou encore, à la différence des conditions de culture.

Tumeurs solides

Goranson, McBride et Weber (1954) ont remarqué que la phosphorylase de l'hépatome et de la tumeur de la glande mammaire de la souris sont inactives en l'absence d'AMP. Mais aucune différence significative entre l'activité phosphorylasique du foie d'animaux tumoraux et du foie d'animaux normaux, n'a pu être contrôlée lorsque cette activité est mesurée en présence du 5'-AMP. Ces auteurs ont envisagé la possibilité que l'utilisation d'AMP dans la synthèse des molécules de nucléoprotéines rende le système phosphorylasique inactif in vivo.

Nirenberg (1958, 1959) a étudié l'activité phosphorylasique du sarcome de Rous induit par le virus dans le muscle du poulet. Il a remarqué que ce sarcome a un dixième de l'activité du muscle de poulets normaux. L'AMP est capable d'augmenter l'activité phosphorylasique de ce sarcome de 20 p. 100 (environ).

Tableau VI

L'activité phosphorylasique dans le sarcome de Rous
(d'après Nirenberg 1959)

Tissu	mole P / 10 min / mg protéine	
	- AMP	+ AMP
Muscle du poulet (normal)	1,63	7,23
Sarcome de Rous	0,165	0,204

Contrairement aux données de Coranoson et ses collaborateurs (1954), Hadjiolov et Dancheva (1958) n'ont pu obtenir une activation considérable de la phosphorylase par l'AMP dans la tumeur du foie de rat. Ces derniers auteurs ont constaté une activité faible dans la tumeur du foie. Shapiro et Wertheimer (1943) constatent une réaction phosphorylasique dans les tumeurs.

Tumeur d'ascite

Wu (1959) a étudié l'activité phosphorylasique de cellules HeLa en culture. Il a remarqué que l'activité phosphorylasique peut varier avec la condition de la culture. Les cellules cultivées dans un milieu de Hanks additionné de 20% de sérum de cheval représentent plutôt une phosphorylase sous forme a (mesuré en l'absence d'AMP). Par contre, les cellules cultivées pendant une semaine dans le milieu de Hanks plus sérum de cheval 20% + sérum humain 10% ne représentent la phosphorylase a que sous une quantité minime. Si le milieu de la culture est alors changé au milieu de la semaine, la phosphorylase a redevient la forme prédominante. Selon cet auteur, l'étape limitante de la glycolyse endogène est constituée par la phosphorylase.

Les recherches de Nirenberg (1959) mènent à une conclusion totalement différente. Ce dernier auteur n'observe qu'une activité phosphorylasique négligeable dans les cellules HeLa en culture. D'après les données de cet auteur, la phosphorylase ne joue pas un rôle important dans la glycolyse des cellules HeLa.

Cellules de tumeurs ascitiques

Nirenberg (1959) a étudié le comportement de la phosphorylase et de ses enzymes activatrices au niveau des différents types de cellules ascitiques, les données sont comparées avec l'activité du foie normal de la souris.

Tableau VII

(d'après Nirenberg 1959)

Tissus	Le mole P / 10 min/mg protéine	
	-AMP	+AMP
Foie normal (souris)	1,57	1,56
Ascite d'hépatome	0,125	0,099
Ascite de leucémie lymphoïde	0,114	0,116
Ascite plasmocytaire	.....	0,993
Ascite mastocytaire	0,0613	0,0674
Ascite de cancer 2 de Krebs	0,144	0,135
Ascite de sarcome 37	0,140	0,134
Cancer He La ..... (en culture)	0,116	0,129

L'activité phosphorylasique a été évaluée dans le sens de la dégradation du glycogène. D'après ces données, il est évident que l'hépatome n'a qu'un dixième ou qu'un douzième de l'activité du foie normal. Par un contrôle histochimique, on a trouvé que l'activité est exclusivement limitée aux leucocytes polycucléaires présentes dans les tumeurs. Aucune activité n'a pu être décelée au niveau des cellules de tumeurs par la méthode histochimique. Cet auteur a donc conclu que l'activité phosphorylasique présente dans l'homogénat de la tumeur est exclusivement due à la phosphorylase des leucocytes polynucléaires. Mais la culture des cellules He La est relativement pure et a une activité faible mais significative.

Lorsque la déphosphophosphorylase ou la phosphorylase inactive est ajoutée à l'homogénat de la tumeur He La, de l'hépatome et du cancer d'Ehrlich, elle est vite transformée en forme active. Ceci indique que ces tumeurs sont peut-être riches en phosphorylase kinase, l'enzyme transformatrice de la phosphorylase inactive en forme active. Il est aussi probable

que ces tumeurs soient riches en 3',5'-AMP cyclique. L'addition de la phosphorylase kinase à l'homogénat augmente l'activation de la phosphorylase dans l'hépatome seulement.

L'adrénaline (50 µg/ml) et le glucagon (25 µg/ml) sont incapables d'activer la phosphorylase de l'hépatome de la tumeur ascitique d'Ehrlich.

L'activité de la phosphorylase-phosphatase des tissus tumoraux est très faible. Aucun inhibiteur puissant de la phosphorylase n'a été trouvé dans les cellules tumorales.

B. SPECIFICITE DE LA PHOSPHORYLASE SELON UN ORGANE DETERMINE

DIFFERENCES IMMUNOLOGIQUES

Henion et Sutherland (1957) ont entrepris une étude pour démontrer les différences immunologiques de la phosphorylase. Ils ont fait la phosphorylase du myocarde et la phosphorylase hépatique, l'objet de leurs investigations. La phosphorylase de ces deux organes du chien a été injectée au canard et au lapin. Les anticorps ainsi obtenus à partir des animaux injectés ont été mis en contact avec la phosphorylase spécifique. Le précipité anticorps-antigène ainsi formé est toujours inactif catalytiquement. L'activité enzymatique est considérablement diminuée ou même totalement abolie.

Ils ont remarqué que les phosphorylases des différents organes du chien ne réagissent pas de la même façon à l'égard des antiséra. Parfois la différence est évidente, par exemple l'antisérum de la phosphorylase du coeur n'inhibe point la phosphorylase hépatique.

La phosphorylase du même organe mais de différentes espèces a un comportement variable à la réaction de l'antisérum.

En somme, les résultats de ces expériences démontrent d'une façon définitive que les phosphorylases de différents organes du même animal sont immunologiquement différentes. Les recherches démontrent aussi que la phosphorylase d'un organe particulier des différentes espèces diffère aussi immunologiquement.

Jókay, Bot et Szilagyi (1958) ont recherché les propriétés antigéniques de la phosphorylase du muscle, et ont obtenu des résultats identiques.

AUTRES DIFFERENCES

A part les différences immunologiques, les phosphorylases de différents organes se comportent différemment à l'égard des activateurs, des inhibiteurs et des hormones. La phosphorylase musculaire a un poids moléculaire de 500.000 (environ), tandis que la phosphorylase hépatique a un poids moléculaire de 260.000 (environ).

La phosphorylase du muscle est activée par les agents réducteurs. Par contre, la phosphorylase hépatique ne montre aucune activation en présence des agents réducteurs (Sutherland et Wosilait 1956).

Le glucagon provoque une augmentation du taux de la phosphorylase hépatique, la surrénale est activée par l'A.C.T.H., mais non la phosphorylase hépatique (Haynes 1958).

Les différences entre la phosphorylase musculaire et la phosphorylase hépatique sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau VIII

	Phosphorylase du muscle		Phosphorylase du foie	
	Forme a	Forme b	Forme active	Forme inactive
Solubilité à pH 7,2 l'eau	Insoluble	Soluble	Soluble	Soluble
$S_{20\,w}$	13,2	8,2	8,4	8,4
Effet de :				
5'-CMP, 5'-GMP et 5'-UMP	aucune activation	aucune activation	activation considérable	Aucune activation
5'-AMP	activation 50% env.	activation 100%	activation 15 à 40%	"
cyclique 3',5'-AMP	"	"	activation	activation
Cystéine	activation		aucune activation	
Glucagon	aucune activation	aucune transformation	activation considérable	transformée en forme active

Chapitre IX

LES ENZYMES DE LA SYNTHESE ET DE LA DEGRADATION DU GLYCOGENE

A. BRANCHING ENZYME ou L'ENZYME BRANCHANTE

Nous avons déjà signalé que la molécule du glycogène est constituée par des molécules du glucose enchaînées par les liaisons α 1,4 et α 1,6. La phosphorylase elle-même est capable de synthétiser in vitro seulement les liaisons α 1,4 glucosidiques. Elle est incapable de synthétiser ou de dégrader les liaisons α 1,6. Or, la synthèse du glycogène doit être faite par la synthèse des liaisons α 1,6 ainsi que les α 1,4. Quel est donc le facteur responsable de la synthèse des liaisons α 1,6 du glycogène ? Cori et Cori (1943) ont remarqué que la phosphorylase du muscle synthétise in vitro un polysaccharide qui ressemble à la fraction amylosique (liaison α 1,4) de l'amidon. Ils ont trouvé que l'action simultanée de la phosphorylase du muscle et d'extrait thermolabile du coeur ou du foie provoque la formation d'un polysaccharide qui ressemble au glycogène naturel. Ces auteurs ont alors conclu que la formation de polysaccharides ramifiés, tels que l'amylopectine ou le glycogène, résulte de l'action simultanée de deux enzymes, d'une part de la phosphorylase et d'autre part d'une enzyme responsable de la synthèse des liaisons α 1,6 glucosidiques.

Haworth, Peat et Bourne (1945) après avoir étudié le problème de la synthèse des liaisons α 1,6 dans le polysaccharide des tissus végétaux dénommèrent l'enzyme responsable de la synthèse des liaisons 1,6, la "Q-enzyme". Puis, ils élucidèrent le mécanisme de l'action de cette enzyme (revue de Peat, 1951). L'enzyme réagit sur les chaînes amylosiques selon le schéma suivant :

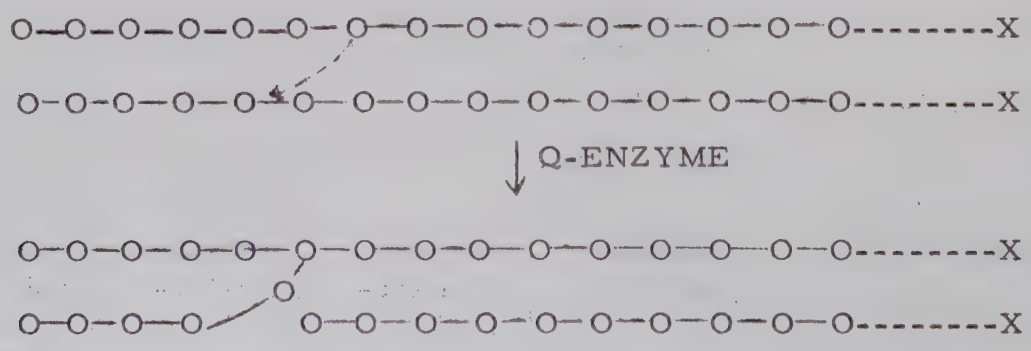


Figure 11, représentant l'action de l'enzyme-Q" (x, bout réducteur ; o-o-o, enchaînement du glucose)

L'action de l'enzyme branchante, tant du foie que du muscle, ainsi que la "Q-enzyme" de la pomme de terre a été étudiée surtout par Larner (1953) qui eut recours à du glycogène possédant les chaînes amylosiques libres marqués aux carbones (C^{14}) du glucose. Ce glycogène fut soumis à l'action successive de l'enzyme branchante et de la phosphorylase. Cet auteur nota que les molécules de glucose ainsi marquées qui se trouvaient antérieurement dans les chaînes extérieures, après l'action de l'enzyme branchante, se retrouvent incluses dans les chaînes amylosiques situées entre deux liaisons 1,6. Avec l'augmentation de poids moléculaire de glycogène par l'action successive de la phosphorylase et de l'enzyme branchante, les molécules glucosidiques marquées pénètrent de plus en plus à l'intérieur de la molécule glycogénique. Larner a donc conclu que les liaisons 1,6 du glycogène sont synthétisées d'une manière analogue à celle du polysaccharide ramifié des tissus végétaux. Il a aussi remarqué que l'enzyme branchante exige une certaine longueur de chaîne amylosique pour que son action puisse se manifester. Le glycogène à chaînes amylosiques libres constituées par seulement 6 unités glucosidiques n'est pas capable d'activer l'enzyme branchante du foie, au contraire, les chaînes libres constituées par 11 à 21 unités de glucose sont capables d'activer l'enzyme. L'enzyme branchante de la pomme de terre est capable de transformer rapidement le polysaccharide renfermant de 13 à 14 unités glucosidiques au niveau des chaînes libres. Mais l'action de la "Q-enzyme" est très lente sur l'amylose dont on sait qu'il n'a que des liaisons α 1,4 dans sa chaîne.

B. L'AMYLO-1,6-GLUCOSIDASE

(l'enzyme débranchante)

La phosphorylase est responsable de la dégradation des liaisons α 1,4 glucosidiques dans la molécule du glycogène. Après la dégradation des liaisons α 1,4 des chaînes libres, l'activité phosphorylasique est stoppée au niveau des ramifications de la molécule glycogénique.

La phosphorylase n'est capable ni de digérer ni de dépasser les liaisons α 1,6 glucosidiques.

La dégradation des liaisons α 1,6 glucosidiques est complétée par une glucosidase. Le mécanisme d'action de cette glucosidase a fait l'objet de recherches de Cori et Larner (1951). Ils ont constaté que la dégradation complète du polysaccharide ramifié est réalisée par une digestion successive au moyen de la phosphorylase et de l'amylo-1,6-glucosidase. L'amylo-1,6-glucosidase ou enzyme débranchante ne peut réagir que lorsque les liaisons α 1,6 glucosidases ont été soumises au préalable à l'action de la phosphorylase.

Ils ont remarqué de plus que le produit résultant de l'action glucosidique est le glucose et non le glucose-1-phosphate.

Larner et Schlisefeld (1956) ont étudié de manière plus approfondie les propriétés de cette enzyme. Ils ont employé comme substrat la limite-dextrine de la phosphorylase. Selon ces auteurs, cette enzyme a un pH optimum entre pH 7,2 et 7,6.

Cette enzyme est inhibée totalement par l'isomaltose (0,0012 M), par le mannose (0,002 M) et par le glucose-1-phosphate (0,003 M). Le glucose n'inhibe pas la réaction de cette enzyme. La phosphorylase-limite dextrine "débranchée" est un inhibiteur compétitif.

Parmi les inhibiteurs des enzymes sulfhydrilées, le p-chloromercuribenzoate (PCMB) à la concentration de 10^{-5} M inhibe complètement cette enzyme. Le 0-iodosobenzoate n'a qu'une faible action inhibitrice et l'iodoacétate est dépourvu d'effet inhibiteur.

Aucune action réversible de cette enzyme n'a pu être observée par Larner et Schliselfeld (1956).

Chapitre X

LA GLYCOGENOSE ET LA PHOSPHORYLASE

En 1929, Von Gierke découvre, à l'autopsie de deux enfants une infiltration massive de glycogène au niveau du foie et de rein . Il a pu démontrer que le glycogène ne disparaît même pas dans le cadavre. Il conclut de ce phénomène à un trouble de la glycogénolyse. Cette forme de la glycogénose hépato-rénale est fréquemment appelée "Maladie de Von Gierke". Pendant les années suivantes, d'autres variétés de glycogénose ont été découvertes, telles que la forme cardiaque ou la forme hépato-musculaire. Plusieurs auteurs ont recherché en vain l'origine de ce trouble. Ce sont les travaux de C.T. Cori et Illingworth (1952) qui ont remanié nos connaissances sur la physiopathologie de la glycogénose. Le trouble semble se situer dans le système enzymatique de la synthèse et de la dégradation du glycogène.

Une nouvelle classification des glycogénoses selon la structure du glycogéne et la perturbation glycogénique a pu être établie (C.T. Cori 1954).

On peut distinguer 4 types de glycogénoses :

Type I - glycogénose hépato-rénale, caractérisée par l'absence ou par la diminution de l'activité de la glucose-6-phosphatase et un glycogène de structure normale (Cori et Cori 1952).

Type II - forme cardiaque ; aucune perturbation de la phosphorylase et d'autres enzymes. La structure du glycogène ne présente aucune anomalie.

Type III - glycogénose diffuse avec cirrhose hépatique, où le glycogène a une structure anormale par absence de l'amylo-1,4-1,6-transglucosidase (enzyme branchante) : l'activité phosphorylasique reste normale.

Type IV - glycogénose généralisée, où le glycogène est caractérisé par des chaînes extérieures remarquablement courtes dues à l'absence de l'amylo-1,6-glucosidase (enzyme débranchante). (Illingworth, Cori et Cori 1956) ; la phosphorylase reste normale.

Puisque la maladie des glycogénoses est accompagnée d'un trouble de la glycogénolyse, il est permis de penser que cette perturbation est due à la diminution de l'activité phosphorylasique. Or, il n'en est rien.

Dans aucune des variétés de cette maladie une diminution significative de la phosphorylase n'a pu être observée. Dans la maladie du type IV l'absence de la dégradation du glycogène peut être expliquée par la perturbation de l'amylo-1,6-glucosidase (l'enzyme débranchante), mais dans les autres cas, aucune explication de la glycogénose ne peut être avancée.

On peut croire que la maladie de la glycogénose pourrait être accompagnée d'une synthèse accélérée du glycogène. Hauk, Illingworth, Brown et Cori (1959) ont étudié l'activité de l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase, l'enzyme de la synthèse du glycogène, découverte par Leloir et Cardini (1957). Ces auteurs n'ont pu remarquer une accélération de l'activité de cette enzyme. Le problème des glycogénoses restait donc entier.

En 1959, Mommaerts et ses collaborateurs et Schmidt et ses collaborateurs travaillant indépendamment, ont rapporté une sorte de myopathie hymaine accompagnée d'une accumulation considérable de glycogène (4% environ). Ils ont trouvé que cette variété de glycogénose est caractérisée par la diminution ou par l'absence totale (Schmidt et coll., 1959 ; Mommaert et coll. 1959) de l'activité phosphorylasique. Selon ces auteurs ce phénomène explique l'absence de la dégradation du glycogène.

Lamy et ses collaborateurs (1960) ont rapporté trois observations d'une nouvelle variété de glycogénose hépatique caractérisée par une absence d'activité de la phosphorylase hépatique.

Les cas de glycogénoses mentionnés viennent à l'appui de l'hypothèse que la phosphorylase réagit uniquement dans le sens d'une dégradation du glycogène, tandis que la synthèse est réalisée par l'uridine diphospho-glucose-glycogène-transférase.

Chapitre XI

PHOSPHORYLASE DANS LES CONDITIONS EXPERIMENTALES

EFFET DU JEUNE

Les recherches de Lundbaek et Coranson (1949) sur la phosphorylase du muscle de rats nourris et de rats à jeûn pendant 1 à 4 jours signalent une augmentation de la phosphorylase a (forme active), mesurée en l'absnece de l'AMP. Ces résultats sont statistiquement significatifs. Selon ces auteurs le taux de la phosphorylase a dans le muscle de rats nourris est de 51 % tandis que ce taux augmente chez les rats à jeûn à 91 pour cent. Ils ont mesuré l'activité phosphorylasique aussi bien vers la synthèse que vers la dégradation du glycogène. L'augmentation de l'activité de la phosphorylase a été constatée dans les deux directions. De plus, ils ont remarqué que la phosphorylase totale, mesurée en présence d'AMP, est également augmentée chez les rats à jeûn par rapport aux rats normaux.

Le retour à l'activité normale a été remarquée chez les rats un jour après la reprise de l'alimentation normale. Aucune relation entre l'activation de la phosphorylase et la durée du jeûne n'a pu être décelée.

Leonard (1957) n'a obtenu aucune augmentation de l'activité phosphorylasique dans le muscle des lapins à jeûn.

Reiter et Noé (1957) ont remarqué que chez les souris à jeûn pendant 24 heures, l'activité phosphorylasique de foie est à peu près moitié moindre par rapport aux souris normales. Cette activité faible est encore considérablement diminuée si les souris à jeûn reçoivent 2 µg/g d'amanite après leur période de jeûne.

Pour Niemeyer, Gonzalez et Rozzi (1961) la phosphorylase active du foie diminue jusqu'à 40% chez les rats à jeûn. L'activité de cette forme de la phosphorylase redevient normale 3 jours après réalimentation.

EFFET DU REGIME

Nimni, Carminatti et Dellacha (1958) ont entraîné quelques rats à un régime à prédominance lipidique et d'autres à un régime à prédominance glucidique pendant 45 jours. Les rats ainsi adaptés ont été mis au jeûne pendant 24 heures. Les rats adaptés à un régime lipidique montrent un niveau d'activité phosphorylasique du foie plus élevé que les rats au régime glucidique. Ils ont remarqué que la réalimentation augmente vite l'activité phosphorylasique du foie. Après 3 heures de réalimentation, l'aliment étant toujours dans l'estomac et dans l'intestin, une augmentation considérable est constatée chez les rats adaptés au régime glucidique.

EFFET DE STRESS

Cori (G.T.), en 1945, a constaté que dans le muscle à l'état de repos, la forme prédominante de la phosphorylase est la forme active. La contraction musculaire provoquée par la strychnine ou par la stimulation électrique entraîne une transformation de la forme active en forme inactive (forme b). La phosphorylase a ne peut être isolée à partir du muscle à l'état de fatigue. Madame Cori a remarqué que la phosphorylase a est récupérable dans le muscle après une courte période de repos.

Plus tard, Krebs et ses collaborateurs (1955) ont découvert que la forme prédominante de la phosphorylase dans le muscle, à l'état de repos, est la forme inactive (forme b). Se basant sur cette méthode, C.F. Cori (1956) a remarqué que l'équilibre des deux formes de la phosphorylase est déplacé vers la forme active pendant la contraction musculaire. La forme active diminue pendant le repos. La fatigue musculaire est associée à une disparition complète de la forme active. Le processus de la récupération de la forme active dans le muscle fatigué est accéléré sous l'influence de l'adrénaline.

EFFETS DES RAYONS ULTRAVIOLETS

Shapiro et Wertheimer (1943) ont constaté que la phosphorylase cristallisée du muscle perd son activité lorsqu'elle est soumise au rayonnement ultraviolet pendant 60 minutes.

EFFETS DE LA CHALEUR

Shapiro et Wertheimer (1943) ont remarqué que la phosphorylase du muscle est complètement détruite dans 10 minutes à 60°C et en 20 minutes à 55°C. Mais l'activité persiste après incubation à 50°C pendant 60 minutes.

EFFET DE LA SURRENALECTOMIE

Holmes et Lahman (1940) ont constaté que l'activité phosphorolytique du broyat du foie reste inchangée après surrénalectomie. Par contre l'activité phosphorylasique vers la synthèse du glycogène est diminuée chez les animaux surrénolectomisés.

Verzár et Montigel (1942) ont constaté que la phosphorolyse du muscle chez les rats surrénalectomisés est presque complètement abolie. Par contre, Shapiro et Wertheimer (1943) ont observé une diminution nulle ou négligeable de l'activité phosphorylasique du muscle des rats surrénalectomisés de 10 à 30 jours. La constatation de Shapiro et Wertheimer (1943) a été confirmée par les recherches de Helve (1944) et de Riesser (1945).

Stählein et Vogtli (1948) ont observé une diminution considérable de la phosphorolyse du glycogène dans le muscle et dans le foie des rats et des chats surrénalectomisés, confirmant ainsi les résultats de Verzar et Montigel (1942). Ils ont trouvé que l'administration de la désoxycorticostérone in vivo peut rétablir l'activité phosphorolytique du glycogène diminuée chez les chats surrénalectomisés. La désoxycorticostérone in vitro est capable de réactiver seulement partiellement l'activité phosphorylasique du muscle des chats surrénalectomisés. La cystéine in vitro augmente la phosphorolyse du glycogène du muscle des rats et des chats surrénalectomisés. L'action du glutathion n'est pas aussi prononcée que celle de la cystéine.

Leonard (1957) n'a pu trouver aucune diminution de l'activité phosphorylasique du muscle chez les rats surrénalectomisés.

Pour Hess, Shaffran et Everitt (1960) l'adrénalectomie diminue le taux de l'activité de la phosphorylase hépatique.

EFFETS DE LA THYROIDECTOMIE

Shapiro et Wertheimer (1943) ont étudié l'effet de la thyroïdectomie sur l'activité phosphorylasique du rat. Les rats thyroïdectomisés ont montré une activité normale de la phosphorylase dans le muscle. Le résultat est identique pour les rats étudiés pendant une période de 1 à 4 mois après la thyroïdectomie.

EFFETS DES DERIVES DE LA SULFONYLUREE

Les dérivés de la sulfonylurée sont connus comme des agents hypoglycémiants. L'administration d'une dose thérapeutique provoque une diminution du glucose dans le sang. Il paraît que ces sulfonylurées empêchent la glycogénolyse dans les tissus. Mais on ignore encore si cette inhibition de la glycogénolyse est due à l'inhibition de la phosphorylase active qui provoque la dégradation du glycogène dans les tissus sous l'influence de l'adrénaline ou du glucagon (dans le foie).

Berthet, Sutherland et Makman (1956) ont étudié l'effet de N-toluène - sulfonyl-N' - n butylurée et d'autres sulfonylurées sur la phosphorylase du foie. Ils ont remarqué que l'administration de la première sulfonylurée n'inhibe pas l'action du glucagon dans le foie. La production du glucose dans la tranche du foie est inhibée par une dose élevée de cette sulfonylurée. Cette dose est beaucoup plus élevée que la concentration nécessaire pour obtenir une action des sulfonylurées in vivo.

L'activation de la phosphorylase par des sulfonylurées dans les coupes de foie ne se produit qu'à une concentration extrêmement élevée (3×10^{-3} M). Aucun rapport entre l'activité in vivo et l'activité in vitro n'a été trouvé.

Les coupes et l'homogénat de foie de rats traités par des sulfonylurées restent également sensibles à l'action de l'adrénaline et du glucagon.

Berthet et ses collaborateurs alors concluent que l'action hypoglycémiante du N-toluène - sulfonyl-N' - n butylurée et d'autres dérivés de la sulfonylurée n'est pas due à l'inhibition de la phosphorylase.

Bose, Vijayvargiya et Sharma (1958) n'ont, eux aussi, pu trouver une activation de la phosphorylase sous l'influence de la butylsulfonylurée (tolbutamide).

Deuxième Partie

ETUDES HISTOCHIMIQUES

Chapitre I

ETUDES HISTOCHIMIQUES ANTERIEURES

Yin et Sun (1947), deux auteurs chinois, sont les premiers à appliquer le principe de la mise en évidence de l'activité phosphorylasique à des coupes de germe de soja, (trempé dans l'eau pendant une nuit). Ce germe ne contient normalement pas d'amidon naturel. Les coupes de soja ainsi préparées sont incubées pendant 30 à 60 minutes dans une solution de glucose-1-phosphate à 1%, tamponnée par l'acétate à pH 6,0. Après l'incubation, le polysaccharide synthétisé dans ces coupes est révélé par une solution d'iode dans l'iodure de potassium (solution de Lugol). Le polysaccharide synthétisé se colore en bleu.

Ces auteurs ont trouvé une réaction intense dans la gaine radiculaire et dans les burgeons latéraux et moins intense dans les feuilles jeunes, l'hypocotyle et l'extrémité de la tige. L'activité est minima dans les cotyledons.

Ils ont apporté les preuves suivantes pour démontrer que la réaction est due à la phosphorylase :

1. Si du glucose est ajouté au milieu d'incubation à la place du glucose-1-phosphate, le polysaccharide (l'amidon) n'est pas synthétisé.

2. La présence de fluorure de sodium à la concentration de M/200 n'inhibe pas la réaction phosphorylasique. Mais à cette concentration de FNa, la phosphatase est complètement inhibée. Donc il ne s'agit pas d'une activité phosphatasique.

3. Les coupes bouillies ne montrent aucune réaction.

A la suite de cette recherche, plusieurs auteurs ont essayé de démontrer cette activité dans des tissus animaux. Il faut cependant signaler que les données relatives à la phosphorylase des tissus végétaux ne sont pas tout à fait transposables aux tissus animaux. L'existence dans ces derniers de deux formes de phosphorylases, l'une active

(forme a) et l'autre inactive (forme b), a rendu l'étude de la phosphorylase assez délicate.

Cobb (1953) a été parmi les premiers à essayer la mise en évidence du siège de l'activité de la phosphorylase dans les coupes du cartilage et de l'os (non-décalcifié). Elle prépara des coupes de la manière suivante :

Le tibia, coupé en deux, est congelé dans l'isopentane à -150°C. Le morceau d'os ainsi congelé est déshydraté pendant 30 jours à -30°C sous vide. Le tissu déshydraté est ensuite inclu dans le "carnauba-wax" qui facilite la coupe des tissus non-décalcifiés et qui est soluble dans le chloroforme.

Les coupes ont une épaisseur de 8 µ. La mise en évidence est réalisée comme suit :

1. Déparaffiner dans le chloroforme ..... 10 minutes
2. Incuber les coupes dans la salive ou dans la solution d'amylase pendant ..... 90 minutes
3. La coupe est trempée dans l'eau distiliée pendant la nuit pour se débarrasser des sels solubles de l'os, surtout des phosphates ..... 15 heures
4. La coupe est ensuite chauffée à 60°C, immergée sous quelques gouttes d'eau distillée, afin d'inactiver la phosphoglucomutase ..... 15 minutes
5. Incubation dans une solution de glucose-1-phosphate et de chlorure de baryum tamponnée par l'acétate (pH = 5,9). La durée d'incubation est de ..... 6 heures
6. Après incubation, les coupes sont fixées dans l'alcool absolu et colorées par la méthode de Hotchkiss.

Cobb a trouvé une réaction phosphorylasique dans les cellules qui, normalement, contiennent du glycogène.

Goldberg, Wade et Jones (1952-1953) ont essayé de mettre au point une technique pour la mise en évidence de la phosphorylase. Leurs études ont porté sur le foie et sur le rein des rats (à jeun, nourris, mâles, femelles, jeunes et âgés); sur l'utérus de lapine castrée, traitée par l'œstrone, ou par la progestérone ; sur l'utérus humain.

L'étude a été réalisée sur les tissus non fixés, coupés au cryostat.

Dans leur milieu, ils ont ajouté du fluorure de sodium afin d'inhiber l'activité des phosphatases acides. Le siège de l'activité de la réaction a été démontré par l'acide periodique Schiff (PAS) et par le carmin de Best. Parfois ils ont employé la méthode à la vapeur d'iode, dégagée par une solution de Lugol. Quelques lames ont été colorées par la technique des phosphatases de Gomori (mise en évidence du phosphate libéré par la réaction phosphorylasique).

De plus, leurs études ont porté sur l'influence de quelques agents chimiques sur l'activité de la phosphorylase.

Les résultats obtenus par les auteurs peuvent être résumés comme suit :

Foie - Réaction très souvent dans la périphérie des lobules et dans la région périportale; mais beaucoup de variations ont été rencontrées.

Rein - Réaction dans la partie proximale des tubes contournés.

Muscle utérin - Réaction très manifeste.

Endomètre - Variable selon l'individu et la condition hormonale du sexe.

Ces auteurs ont observé une variabilité considérable, suivant les organes et dans les différentes parties du même organe. Mais le siège de l'activité au niveau du foie du même animal restait identique. Les auteurs n'ont pu trouver la raison de ces irrégularités, et ils n'ont pas pu en tirer de conclusion valable.

Leurs études expérimentales ont apporté les résultats suivants :

pH et tampons - meilleurs résultats obtenus aux pH 6,8 et 6,0. Les tampons véronal et acétate ont une action comparable.

Cystéine et glutathion -
La présence ou l'absence de cystéine à 0,015 M et 0,0015 M a montré des résultats satisfaisants. Le glutathion à 0,025 M inhibe partiellement la réaction.

Proportion de Na^+ et K^+ - Aucun effet n'a été obtenu en changeant la proportion de ces deux ions.

Ions bivalents -
Ca^{++} (0,036 M) : bons résultats ; Ba^{++} (0,013 M) : indifférent ; bons résultats en présence de nitrate de plomb (0,1%).

Co-facteurs -
Acide adénylique : aucune accentuation
Hexose diphosphate : aucune accentuation.

Température - Résultats semblables à 30°C et à 37°C.

Fluorure de sodium - Aucune inhibition n'a été remarquée lorsque la concentration a été augmentée jusqu'à 0,1 M.

Ethanol - Le glycogène est synthétisé même en présence d'alcool à 20% (par volume).

Glycogène - N'est pas indispensable.

Florizine - Inhibe considérablement la réaction à la concentration de 0,01 M.

Il parait évident que les anomalies obtenues par ces auteurs n'ont pas encouragé d'autres chercheurs à étudier l'activité phosphorylasique au niveau des tissus animaux.

Jusqu'à cette date, nous remarquons que la découverte par Cori et ses collaborateurs de l'existence de deux formes de phosphorylases n'a pas été estimée à sa juste valeur par les auteurs d'études histochimiques.

En 1955, Takeuchi et Kuriaki, les deux auteurs japonais, se basant sur les données biochimiques mises à jour par Cori et ses collaborateurs ont mis au point une technique histochimique.

Leur milieu d'incubation comprend :

Glucose-1-phosphate	50 mg
Adenosine monophosphate	10 mg
Glycogène	5 mg
Insuline	10-20 UI
Eau distillée	15 cc
Tampon acétate (pH 5,7-6,0)	10 cc

Les coupes, non fixées, d'une épaisseur de 20 µ ont été incubées pendant 2 ou 3 heures dans le milieu d'incubation. Les coupes sont ensuite traitées par la solution de Lugol pendant quelques minutes et sont montées dans la glycerine iodée. Selon ces auteurs, la réaction phosphorylasique se manifeste par une coloration bleue ou bleue-pourpre tandis que le glycogène préexistant montre une coloration brune.

L'AMP est ajouté dans le milieu d'incubation comme activateur de la phosphorylase inactive, le glycogène comme primer (le glycogène n'a pas été trouvé indispensable pour la réaction) et l'insuline comme l'accélérateur de la glycogénèse.

Ils ont trouvé une réaction intense et régulière dans le muscle strié, dans le myocarde, dans le muscle lisse des artères et des veines, dans le cartilage, dans le cerveau, dans les tubes collecteurs du rein (dans quelques animaux) et dans l'épithélium stratifié (Takeuchi, Higashi et Watanuki, 1955). Watanuki (1957) a recherché la phosphorylase dans les tissus des vertébrés.

De plus, Takeuchi et Kuriaki (1955) ont trouvé que l'ADP et l'ATP sont capables de remplacer l'AMP dans le milieu d'incubation. Ils ont trouvé que le glucose, le β glycerophosphate de sodium et le fluorure de sodium ont une action inhibitrice sur la phosphorylase. Plus tard, Takeuchi (1960) a trouvé une action activatrice du fluorure de sodium.

C'est la technique de Takeuchi et Kuriaki qui, pour la première fois, a pu éveiller l'intérêt des histochimistes pour l'étude de cette activité. Grâce à cette technique, de nombreux travaux ont été réalisés, notamment par Takeuchi et Kinoshita (1956) sur les cellules sanguines et sur les cellules de la moelle osseuse et sur les tissus tumoraux (Takeuchi, Kinoshita et Kobayakawa, 1956). Shimizu et Okada (1957) ont recherché la distribution de la phosphorylase dans le cerveau des rongeurs, des nouveaux-nés et des adultes. Hamuro (1957) a étudié l'activité phosphorylasique dans le cerveau après la blessure provoquée experimentalement. Braun-Falco (1956, 1957), Ellis et Montagna (1958), Yasuda et collaborateurs (1958) et Goltz et ses collaborateurs (1959) ont recherché la phosphorylase dans la peau humaine et dans la peau des singes (Ellis et Montagna, 1959), Macpherson et Pearse (1957) ont étudié cette activité dans le rein dépourvu de potassium. Les travaux publiés jusqu'en 1958 ont été l'objet d'une revue par Wegmann et Verne (1958).

La phosphorylase dans l'utérus a été recherchée en employant la technique de Takeuchi et Kuriaki (1955) par Herbener Atkinson (1959), par Bo (1959, 1961) et par Godlewski et Skurzak (1960) ; dans la glande mammaire par Fanger et Barker (1960) ; dans la surrénale par Planel et ses collaborateurs (1960), dans le muscle à l'état normal et à l'état pathologique par Dubowitz et Pearse (1960) et dans la dent par Sugino (1957).

Chapitre II

RECHERCHES PERSONNELLES

Malgré le fait que la technique de Takeuchi et Kuriaki paraissait satisfaisante dans son ensemble, cette activité n'a pu être décelée, par ses propres auteurs, dans un organe essentiel, le foie, tant chez le rat que chez le cobaye (Takeuchi, Higasi et Watanuki 1955). Une réaction très faible et inconstante a été obtenue chez le lapin. Chez l'homme et chez le chien, la réaction restait toujours modérée.

Or, le foie, connu en général comme le lieu de synthèse par excellence du glycogène, ne semblait, avec la technique de Takeuchi et Kuriaki, guère contenir de phosphorylase décelable histochimiquement, contrairement aux données biochimiques.

Nous avons également retrouvé cette anomalie. Takeuchi et Kuriaki (1955) ont soupçonné l'existence des inhibiteurs puissants dans le foie. Takeuchi, lui-même, n'a pu nous fournir d'explication précise à ce sujet. Dans une communication personnelle (1959), il nous a conseillé d'employer sa technique modifiée qui, en principe, devait rendre la méthode plus sensible, bien que l'enzyme soit très labile. Mais, là aussi, nous n'avions pu obtenir la moindre activité chez le rat.

Les recherches effectuées par Tamada (1958) avec cette technique n'ont pu apporter de résultats positifs dans le foie des rats.

C'est alors que nous nous sommes penchés sur cette question, et que nous avons examiné les conditions de mise en évidence de la phosphorylase dans le groupe des enzymes intervenant dans le métabolisme des polysaccharides (Wegmann et Verne 1958).

Non activation de la phosphorylase du foie par AMP

Au cours de nos recherches sur les enzymes intervenant dans la glycolyse anaérobie, nous sommes rapidement arrivés à la conception que la réaction négative constatée dans le foie n'était une anomalie qu'en apparence. En reprenant les données de la technique de Takeuchi et Kuriaki, selon laquelle l'AMP est un activateur de la phosphorylase, nous avons tout d'abord pensé que la non réactivité du foie était due à la faible concentration de l'AMP dans le milieu où elle dépendait du pH.

Nous avons augmenté la concentration de l'AMP à 0,01 M, concentration dix fois plus élevée que la concentration de l'AMP employée par Takeuchi et Kuriaki. Le résultat fut négatif. Les concentrations intermédiaires n'ont pu apporter une indication positive. Hanes (1940) avait déjà remarqué que la phosphorylase d'origine végétale est insensible à l'action de l'AMP. Il nous a paru intéressant de savoir si c'est le cas pour la phosphorylase du foie. Les coupes du foie furent incubées dans un milieu sans AMP. Là encore, le résultat fut négatif.

Cori et Cori (1943) ont trouvé que le pH optimum pour la phosphorylase du muscle se situe entre pH 6.5 et pH 6.9. Mais pour la réaction de Takeuchi et Kuriaki on emploie un milieu d'incubation réglé à pH 6,0. Nous avons donc pensé que la réaction phosphorylasique du foie pourrait dépendre d'un pH différent. Alors, nous avons employé des milieux toujours échelonnés entre pH 5.5 et pH 7.0.

La modification apportée par ce facteur ne nous a pas davantage permis d'aboutir à un résultat positif.

Dans ce cas, il ne restait qu'une seule explication, celle que l'AMP n'est pas un activateur de la phosphorylase du foie. Notre hypothèse fut aussitôt confirmée par les données biochimiques déjà mises en évidence par Sutherland et ses collaborateurs en 1956.

D'après ces auteurs, comme nous l'avons déjà nous-même remarqué, l'équilibre d'activation dans le foie n'était pas tributaire de l'AMP mais de la phosphorylase phosphatase et de la phosphorylase kinase. (déphosphophosphorylase-kinase).

Ce fait nous a conduit à mettre au point une technique pour la mise en évidence de la phosphorylase.

En effet, nous avons réussi à mettre à profit la découverte par Sutherland et ses collaborateurs de la phosphorylase kinase dans le foie (1956), et par Krebs et ses collaborateurs dans le muscle (1958), ainsi que le fait que la phosphorylase phosphatase (PR enzyme) du muscle et celle du foie (I E) sont inhibées en présence de fluorure de sodium 0,01 M.

Le principe de notre réaction repose sur l'activation de la phosphorylase kinase par l'ATP et de l'ion de magnésium pour synthétiser la forme active de la phosphorylase à partir de la forme inactive (b $\longrightarrow$ a) et en même temps sur l'inhibition de la phosphorylase phosphatase par le fluorure de sodium, afin d'éviter l'action antagoniste de cette phosphorylase phosphatase (a $\xrightarrow{FNA}$ b).

Cette technique nous a permis d'avoir une réaction dans le foie et dans d'autres organes.

Chapitre III

LES PRINCIPES DE LA MISE EN EVIDENCE HISTOCHIMIQUE DE LA PHOSPHORYLASE

On peut se demander comment l'activité phosphorylasique peut être mise en évidence dans les conditions histochimiques. On sait que le glucose-1-phosphate est transformé en polysaccharide et phosphate libre sous l'influence de la phosphorylase selon la réaction suivante :

$$(\text{Glycogène})_n + \text{Glucose-1-phosphate} \rightleftharpoons (\text{Glycogène})_{n+1} + \text{Phosphate}$$

Dans cette réaction peuvent être visualisés tant (a) le polysaccharide synthétisé que (b) le phosphate libéré pour la mise en évidence histochimique.

a) Le polysaccharide synthétisé peut être décelé par les techniques histochimiques classiques tels que la technique de Bauer et Feulgen ou par la réaction de l'acide periodique Schiff (PAS) de McManus. Mais toutes ces techniques indiquées montrent le polysaccharide synthétisé par une coloration identique à celle du polysaccharide préexistant. La distinction entre ces sortes de polysaccharides est faite par la différence de l'intensité. Mais il a été remarqué que par la coloration à l'iode (dans la solution de "Lugol") on peut facilement distinguer le polysaccharide endogène et le polysaccharide néo-formé (Takeuchi et Kuriaki 1955).

Nous rappelons que la molécule de glycogène est constituée par des molécules du glucose. La molécule glycogénique a la forme d'un arbre muni des branches. Ces branches de l'extrémité (chaîne latérale) représentent les chaînes libres de glycogène. Ces chaînes amylosiques sont allongées par l'addition successive de molécules de glucose sous l'influence de la phosphorylase. Swanson (1948) a étudié quantitativement la relation entre la longueur de la chaîne et la coloration à l'iode. Selon cet auteur, les différentes colorations à l'iode peuvent être obtenues selon la longueur de la chaîne amylosique de polysaccharide.

Longueur de chaînes glucosidiques	Coloration à l'iode
Chaîne de 4 à 6 glucoses	Incolore
" 8 à 12 "	Rouge
" 13 à 21 "	Brun-pourpre
" 21 à 30 "	Violet
" 31 et supérieure	Bleu

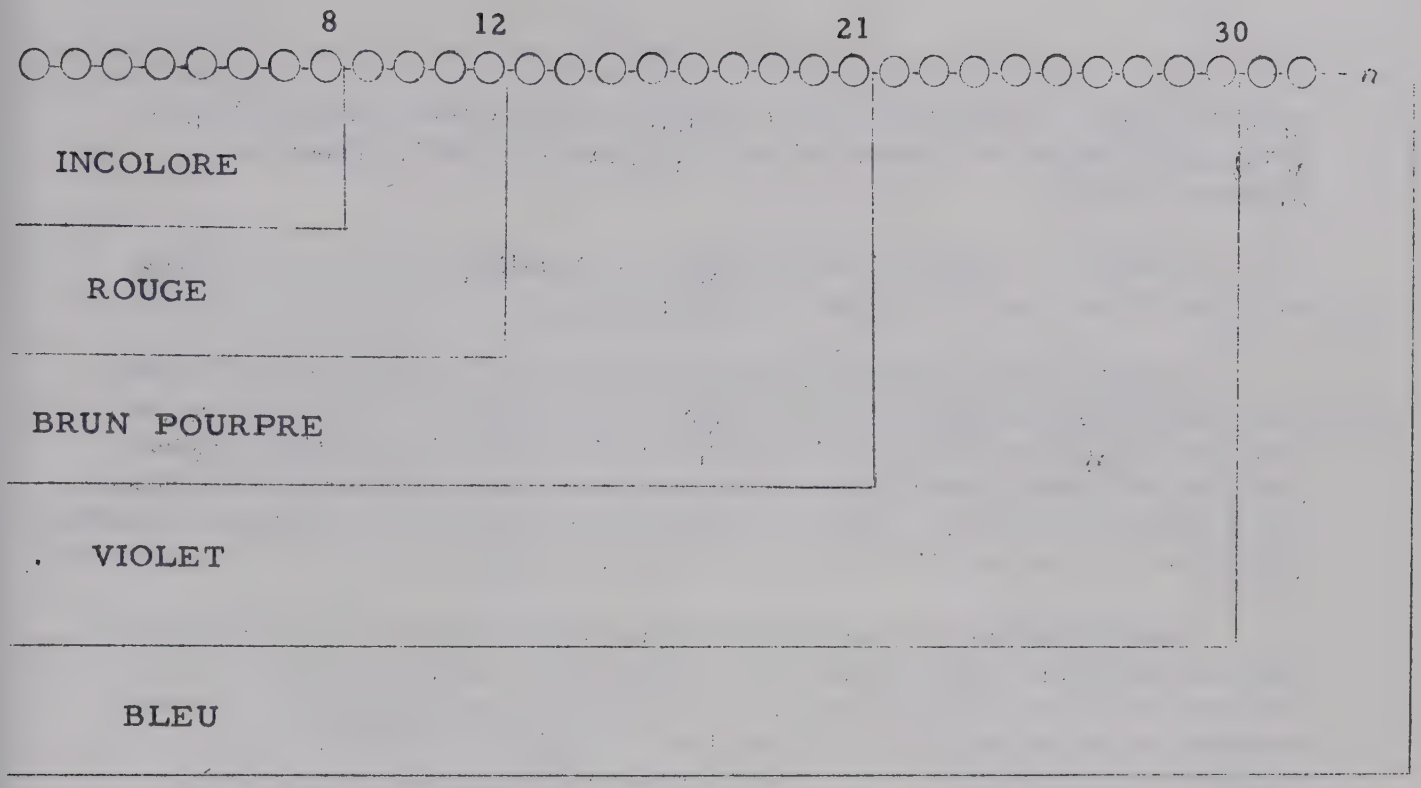


Fig. 12.- La coloration à l'iode selon la longueur de la chaîne amylosique (o-o-o Unités Glucosidiques en enchaînement amylosique)

La méthode de la coloration à l'iode a été trouvée la plus efficace pour la mise en évidence de la phosphorylase et employée par presque tous les auteurs de recherches histochimiques.

b) Le phosphate libéré dans la réaction peut aussi être mis en évidence par la formation d'un sel insoluble dans le milieu acide, ce qui est le principe de la méthode de Gomori pour les phosphatases acides. Mais cette méthode de mise en évidence a, de son côté, des défauts.

Premièrement, si l'activité phosphatasique n'est pas bloquée par un agent inhibiteur, les phosphatases peuvent provoquer la libération de phosphate à partir du glucose-1-phosphate. En ce cas, l'image montrera non seulement l'activité de la phosphorylase mais aussi celle des phosphatases acides.

Deuxièmement, le sel métallique (sel de plomb ou sel de baryum), employé pour la formation d'un sel insoluble de phosphate, peut avoir une action inhibitrice sur la phosphorylase. En effet, cette méthode de

visualisation a été employée par Goldberg et ses collaborateurs (1952 - 1953) et, à juste titre, avait été critiquée par Takeuchi, Higasi et Watanuki (1955).

Nous avons employé la technique de visualisation par la solution de Lugol diluée pour la raison suivante :

L'action de la phosphorylase porte essentiellement sur les chaînes extérieures du glycogène et la coloration du glycogène par la solution de Lugol est également déterminée par les chaînes extérieures (les chaînes amylosiques entre deux liaisons 1,6 étant extrêmement courtes ne se colorent pas à l'iode). De plus, le glycogène préexistant ne montre pas une coloration nette avec la solution diluée de Lugol dans les organes que nous avons étudiés.

Les techniques histochimiques classiques telles que la réaction de l'acide périodique Schiff (PAS) de McManus ou la technique de Bauer et Feulgen ou le carmin de Best (pour le détail de ces techniques, on peut consulter la monographie de Lison, 1960 ou celle de Pearse, 1960) n'étaient employées que pour contrôler parallèlement l'action de l'iode. Ces dernières techniques montrent une localisation identique à celle obtenue par la technique à l'iode. Mais les autres substances non glycogéniques, positives à la réaction du PAS, empêchent, à un certain degré, d'obtenir le contraste désiré. Par contre, avec la coloration à l'iode l'activité phosphorylasique est bien différente des autres organites iodophiles.

Chapitre IV

A. MISE EN EVIDENCE DE LA PHOSPHORYLASE TOTALE

Préparation du milieu d'incubation :

L'adénosine-triphosphate (ATP) et le glucose-1-phosphate sont instables dans le milieu acide. C'est pourquoi nous avons préparé chaque fois une solution de 25 cc.

Le milieu d'incubation comprend :

Glucose-1-phosphate	50 mg
Fluorure de Sodium	21 mg
Adénosine-triphosphate (ATP)	10 mg
Sulfate de magnésium	8 mg
L'eau bidistillée	15 cc
Tampon acétate (0,2 M) pH 6,0	10 cc

Le pH de la solution est ensuite réglé à pH 6,0. La concentration finale du glucose-1-phosphate est de 0,005 M (environ), celle du fluorure de sodium de 0,02 M, celle de l'ATP de 0,00065 M (environ) et celle du sulfate de magnésium de 0,0025 M. La concentration du glucose-1-phosphate était 0,015 M au début de nos études. L'activité de la phosphorylase à cette concentration est identique à l'activité à la concentration de 0,005 M. Dans nos premiers essais, du glycogène était ajouté, mais plus tard on l'a supprimé. Dans les premiers essais le tampon trismaléate de Gomori était employé au lieu de tampon acétate. Celui-là est également satisfaisant comme tampon.

Le fluorure de sodium dans le milieu d'incubation; inhibe l'action de l'enzyme inactivatrice (phosphorylase-phosphatase) de la phosphorylase du foie (Wosilait et Sutherland 1956) et celle du muscle (Keller et Cori 1955). Il inhibe aussi l'action de la phosphoglucomutase (Cowgill et Cori 1955). L'ATP et le sulfate de magnésium active la phosphorylase-kinase qui transforme la forme inactive de la phosphorylase en forme active.

Le milieu témoin a été préparé sans le glucose-1-phosphate.

Le polysaccharide néo-formé a été décelé par la coloration à l'iode.

Cette technique à l'iode-iodure a été déjà employée par des auteurs tels que Yin et Sun (1947) et plus tard a été adaptée par Takeuchi et Kuriaki (1955).

Mise en évidence

1. Couper le tissu non-fixé au cryostat à -20°C (environ) pour les muscles et d'autres organes et à -5°C. pour le foie et le rein.

2. Incuber les coupes dans des petites cuvettes de verre (vases à peser) contenant 2,5 cc de la solution d'incubation pendant 30 minutes à 37°C. Dans les cas exceptionnels le temps d'incubation a été prolongé jusqu'à 2 heures.

3. Rincer à l'eau bidistillée pendant 30 secondes.

4. Immersion dans la solution de "Lugol" diluée (eau : lugol = 10: 1) pendant 10 minutes.

5. Monter dans le sirop d'Apathy ou dans la glycérine iodée.

La coloration produite par la réaction se conserve pendant une semaine et disparaît progressivement. Le temps de conservation est prolongé si les préparations sont conservées au froid. L'obscurité ne modifie rien.

Lower (1957) a proposé une technique pour la préparation permanente des tissus iodophiles. Cette technique est basée sur des principes photographiques qui consiste en une transformation de l'iode, liée au glycogène, en iodure d'argent par un traitement par le nitrate d'argent et cet iodure d'argent est transformé en grains d'argent par un révélateur photographique. Cette technique a été adaptée par Herbener et Atkinson (1959) pour la mise en évidence permanente de l'activité phosphorylasique. Mais nous avons trouvé cette technique inapplicable pour la mise en évidence du siège de l'activité phosphorylasique parce que les autres organites qui ne se colorent pas à l'iode mais qui en retiennent une quantité considérable, sont aussi transformés en noir par la technique de Lower.

B. MISE EN EVIDENCE DE LA PHOSPHORYLASE ACTIVE PREEXISTANTE

Nous avons signalé que dans les organes des animaux adultes, à l'état normal , la forme prédominante de la phosphorylase est la forme inactive et dans cette condition l'activation de la phosphorylase devient nécessaire pour sa mise en évidence. La phosphorylase totale est démontrée par la transformation de la forme inactive en forme active. Mais dans certaines conditions expérimentales (par exemple : sous l'influence in vivo du glucagon) et même dans certaines conditions physiologiques (dans l'utérus pendant la grossesse) la forme active peut être la forme prédominante. Pour cette raison il nous paraît intéressant d'étudier l'activité de la phosphorylase active préexistante par rapport à la phosphorylase totale dans les coupes.

Le milieu a été préparé comme suit :

Le milieu d'incubation :	Glucose-1-phosphate	50 mg
	Fluorure de sodium	21 mg
	Tampon tris-maléate ou acétate pH 6,0.	10 cc
	Eau bidistillée	15 cc

Dans ce milieu les activateurs de la phosphorylase-kinase sont supprimés afin d'empêcher la transformation de la forme inactive des coupes en forme active. Dans quelques essais, le sel disodique de l'éthylènediamine tétraacétate (EDTA) a été employé à la concentration de 0,001 M (9 mg pour 25 cc).

L'EDTA est un inhibiteur de la phosphorylase-kinase. L'inhibition se produit par le chélation d'ions Mg^{++} par l'EDTA.

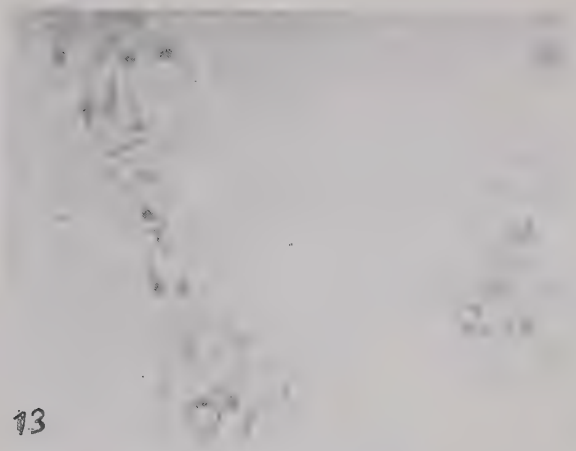
Mais aucune différence entre l'action des milieux sans EDTA et avec EDTA n'a été remarquée. Le reste de la mise en évidence est identique à celle de la technique pour la phosphorylase totale.

C. PREPARATION DES TISSUS

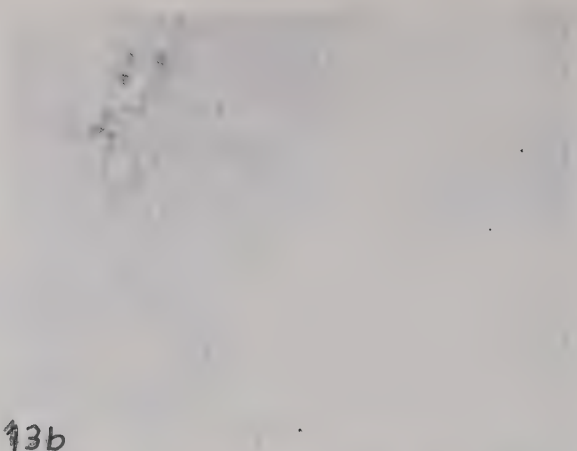
Des rats albinos (souche Wistar) de poids variant entre 125 g et 300 g, des cobayes de 500 g en moyenne et des lapins de 3 kg en moyenne ont été utilisés pour ces études. Ces animaux comprenaient des mâles et des femelles. Ils ont été soumis à un régime de base bien équilibré, adapté à chaque espèce et n'ont pas subi de jeûne avant le sacrifice.

Les animaux ont été assomés, puis saignés. Dans quelques cas, la mort a été obtenue par section du coeur sans anesthésie préalable.
Pour l'étude de l'effet du glucagon, on a utilisé la technique de l'embolie gazeuse en injectant de l'air dans la veine marginale de l'oreille du lapin. Ainsi la mort est instantanée. Les organes prélevés ont été immédiatement congelés et conservés dans un réfrigérateur maintenu à - 30 °. Ce procédé est particulièrement recommandé pour les enzymes susceptibles d'être détruites par des fixateurs tels que l'alcool ou l'acétone. Les pièces congelées, c'est-à-dire non fixées, ont été coupées au Cryostat de Pearse. Cet appareil est garni d'une caisse réfrigérée maintenue à - 20° contenant un microtome dont le fonctionnement est assuré de l'extérieur ; une fenêtre de lucite ménagée dans la paroi permet de contrôler les opérations. Nous ne nous étendrons pas davantage sur la description du cryostat que Pearse étudia en détail dans sa monographie (Histochemistry, theoritical and applied, 2e ed. ; Edit. Churchill, Londres, p. 19, 1960).

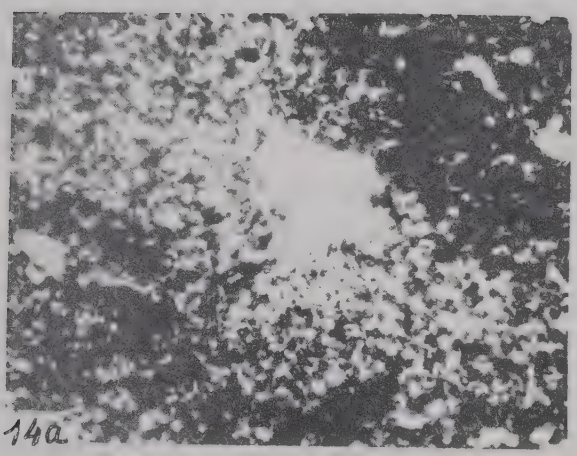
Chaque coupe est recueillie séparément sur une lamelle. La coupe en se réchauffant au contact de la lamelle y adhère parfaitement. On laisse sécher les coupes afin d'éviter le décollement dans la suite des réactions (les réactions enzymatiques dans les coupes séchées et non séchées sont identiques). Ces coupes ont une épaisseur de 14 à 16 μ , ce qui réduit au minimum la diffusion des enzymes tout en laissant encore nette les structures histologiques.



13



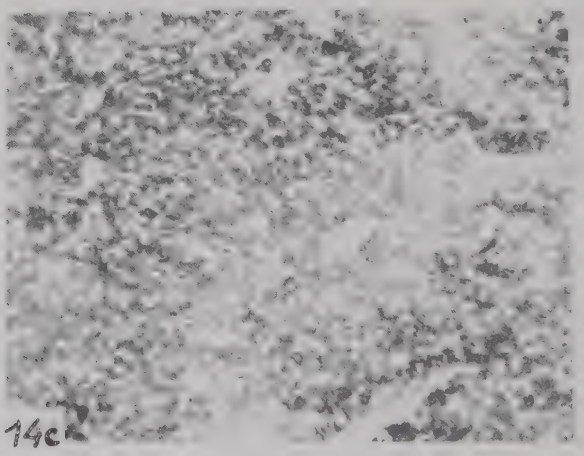
13b



14a

14b

14d



14c

14e

14f

Fig. 13 - La coupe de foie de rat. Le tissu a subi un réchauffement ; l'incubation dans le milieu pour la phosphorylase totale (Gr = 80 d).

Fig. 13 a - La coupe voisine du même foie qu'à la Figure 13 ; l'incubation dans le milieu de la phosphorylase totale sans FNa (Gr = 80 d).

Fig. 14 a - Phosphorylase dans le foie de rat révelée par la réaction de l'acide périodique-Schiff (Gr = 60 d).

Fig. 14 b - Phosphorylase totale dans le même foie révelée par la coloration du Lugol dilué (Gr = 60 d).

Fig. 14 c - Phosphorylase active dans le même foie (Gr = 60 d).

Fig. 14 d - Phosphorylase par l'incubation dans le milieu de Takeuchi et Kuriaki (1955).

Fig. 14 e - La réaction par la solution de Lugol dans la coupe de même foie après incubation dans le milieu témoin de la phosphorylase. La coloration brune est absente (Gr = 60 d).

Fig. 14 f - Coloration par la solution de Lugol d'une coupe de même foie. Aucune coloration brune n'a été obtenue (Gr = 60 d).

Chapitre V

ETUDES EXPERIMENTALES SUR LA TECHNIQUE

1. SPECIFICITE DU SUBSTRAT

La spécificité du substrat a été étudiée par la substitution au glucose-1-phosphate par le glucose-6-phosphate à la concentration de 0,016 M. Les conditions d'incubations demeuraient identiques. Aucune réaction n'a pu être décelée. Ce phénomène démontre que le glucose-6-phosphate est incapable de réagir comme substrat de la phosphorylase. De plus, le glucose-6-phosphate n'est pas transformé en glucose-1-phosphate pendant l'incubation. Il paraît bien que la plusphoglucomutase, l'enzyme qui transforme le glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate ou vice-versa, est effectivement inhibée par le fluorure de sodium, même à la concentration de 0,02 M.

2. EFFET DU FLUORURE DE SODIUM

L'effet du fluorure de sodium a été étudié en incubant des coupes dans un milieu dépourvu de fluorure de sodium. En effet, la différence de la réaction entre les coupes incubées dans le milieu normal, et dans le milieu dépourvu du FNa, est faible pour les tissus fraîchement congelés et coupés. Mais elle devient évidente dans les tissus qui ont subi un réchauffement. Dans ces cas, la réaction se manifeste par plage (fig. 13 et 14).

Le fluorure de sodium est considéré comme un inhibiteur des enzymes qui sont activées en présence d'ions métalliques. Puisque la phosphorylase-kinase a besoin d'ions bivalents, elle aurait pu être inhibée par le FNa. Mais Cowgill et Cori en 1955 et Krebs et ses collaborateurs (1958) ont remarqué que le fluorure de sodium n'a aucune action inhibitrice sur l'activité de la phosphorylase kinase. Nos recherches montrent qu'aucun complexe inactif [Mg] [F] [ATP] n'est formé dans le cas de la phosphorylase-kinase, contrairement à ce qui se produit dans la phosphoglucomutase, comme l'a constaté Najjar (1948). La concentration du fluorure de sodium augmentée jusqu'à 0,1 M n'entraîne aucune inhibition de l'activité phosphorylasique.

3. ADENOSINE TRIPHOSPHATE (ATP)

Les coupes incubées dans un milieu dépourvu d'ATP et de Mg^{++}, sauf quelques exceptions, ne montrent aucune activité. Parfois, dans le foie de cobaye et de lapin, et dans le myocarde, nous avons noté une faible activité. Cette activité est due à l'existence de la phosphorylase active préexistante. Quand l'ATP est remplacé par l'adénosine monophosphate (5'-AMP) ou par l'adénosine diphosphate (ADP) aucune activité ne peut être décelée sur les coupes de foie. Mais pour d'autres organes, l'AMP ou l'ADP sont capables de remplacer l'ATP dans la réaction phosphorylasique.

4. EFFET DE LA PRESENCE D'IONS DE METAUX BIVALENTS

Sutherland et ses collaborateurs (1956) sur le foie, et Krebs et ses collaborateurs (1958) sur le muscle, ont observé que la phosphorylase kinase est activée en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ions Mg^{++}. Rall, Sutherland et Wosilait (1956) ont remarqué que la phosphorylase kinase, même dans l'hémogénat du foie, a besoin d'ions de magnésium exogènes. Les ions de manganèse et de calcium sont incapables de remplacer les ions de magnésium. Par contre, Fischer et Krebs (1955) ont observé, sur le muscle, au cours du processus de transformation des phosphorylases, d'ions d'autres métaux bivalents sont capables de remplacer les ions de magnésium.

Nous avons remarqué qu'il y a une réaction faible tant dans le muscle que dans le foie incubés dans un milieu dépourvu d'ions de métaux bivalents. Il semble que les ions de magnésium présents dans les coupes sont responsables de cette réaction. La phosphorylase active préexistante des coupes est aussi partiellement responsable de la réaction observée. Cependant, l'addition de sulfate de magnésium au milieu d'incubation donne une réaction beaucoup plus intense que lorsque le milieu en est dépourvu.

Nous avons comparé l'intensité de la réaction obtenue en présence d'ions de magnésium avec les réactions effectuées en présence d'autres ions de métaux bivalents. Ainsi, nous avons remplacé le sulfate de magnésium dans le milieu d'incubation par les différents sels de calcium, de cobalt, de manganèse, de nickel (0,0025 M en concentration finale). L'effet des sels de barium, de zinc, de cuivre, de mercure (mercurique) et d'argent a été étudié sur des coupes de muscle et de myocarde. Le milieu d'incubation sans aucun métal bivalent nous a servi comme témoin.

Dans le muscle et dans le myocarde, l'intensité de la réaction est maxima avec le milieu contenant les ions de Mg^{++}. Pour les autres milieux d'incubation, l'intensité de la réaction était dans l'ordre suivant : Mn > Ni > Co > Ca. Un trouble se produit au cours de l'incubation dans le milieu contenant les ions de calcium. Le baryum est indifférent du point de vue d'activation, tandis que les sels de zinc, de cuivre, de mercure, et d'argent inhibent totalement la réaction. Pour les coupes de foie, la présence de magnésium est nécessaire pour obtenir une réaction optimale. La réaction en présence d'ions de nickel est presque aussi intense qu'en présence de magnésium. Le manganèse et le calcium sont incapables d'augmenter l'intensité de la réaction. Nos observations confirment la constatation de Wosilait et Sutherland (1956) relative à la nécessité d'ions de magnésium pour l'activation de la phosphorylase de foie. Mais le besoin absolu d'ions de magnésium exogènes n'est pas prouvé.

5. RCLE DU GLYCOGENE

Le glycogène sert comme "primer" pour l'activité phosphorylasique. En effet, les chaînes amylosiques du glycogène sont allongées sous l'influence de la phosphorylase. Pour cette raison, la présence du glycogène est considérée comme essentielle pour la réaction. Dans nos premiers essais, nous ajoutions 0,4% de glycogène dans le milieu incubateur. Mais quand le glycogène est supprimé de notre milieu d'incubation, aucune variation de l'activité n'a pu être remarquée. Le même phénomène a été observé par d'autres histochimistes, notamment par Goldberg et ses collaborateurs (1952-1953) et par Takeuchi et Kuriaki (1955). Le glycogène était supprimé dans nos essais ultérieurs.

Il est probable que le glycogène préexistant des coupes, et non le glycogène du milieu d'incubation serve de "primer" dans cette réaction. Pour étayer cette hypothèse, nous avons préparé des solutions ajoutant du glycogène, de l'amidon soluble (Prolabo) et de la dextrine dans le milieu d'incubation à la concentration de 0,4%. Le milieu d'incubation, sans aucun polysaccharide a servi de témoin. Aucune intensification de l'activité phosphorylasique n'a été remarquée. Par contre, lorsque la concentration du glycogène est augmentée au-dessus d'un pour cent, la réaction histochimique disparaît totalement, un phénomène déjà observé par Takeuchi et Kuriaki (1955).

6 TEMPERATURE et pH

Pour étudier l'effet des variations de température et de pH, nous avons employé un ensemble d'appareils comprenant un microscope éclairé d'une source lumineuse artificielle, une cellule photoélectrique et un oculaire vertical du microscope enfermés dans un boîtier étanche, un microampère-mètre muni d'un amplificateur à sensibilité variable mesure le courant débité par la cellule photoélectrique.

L'axe du microscope est vertical et le faisceau de lumière sortant de l'oculaire vertical est renvoyé horizontalement au moyen d'un prisme sur la cellule photoélectrique.

La mesure est effectuée sur l'image à faible grossissement (x 30) pour une vue d'ensemble. Un filtre jaune a été mis devant la source lumineuse afin de neutraliser la couleur jaune de la solution de Lugol. Les coupes en série du même organe sont comparées dans les mêmes conditions. La réaction de la coupe témoin (incubée dans le milieu témoin) est considérée comme nulle tandis que la réaction la plus intense traduite par le minimum de la transmission lumineuse est indiquée par4 croix. Les réactions d'intensité intermédiaire sont indiquées par 1 à 3 croix. Au lieu de chiffres, nous avons employé les croix pour la simple raison que l'appareillage que nous utilisons n'est pas à proprement parler un histophotomètre. Cet ensemble d'appareils est à peu près identique à l'appareil histophotometrique de Lison (Histochimie et Cytochimie Animales, 3e ed ; Edit. Gauthier-Villars, Paris, p. 65, 1960) mais les variations portent sur les points suivants : l'appareil que nous utilisons renferme l'oculaire et la cellule photoélectrique dans un boîtier étanche, tandis que dans l'appareil de Lison, la cellule photoelectrique est munie d'un écran vertical, et cet ensemble est fixé sur un bâti indépendant de celui du microscope. Dans le premier cas, nous mesurons la transmission lumineuse à travers une grande surface ou une vue d'ensemble de la coupe tandis que dans l'appareil de Lison l'image est repérée point par point. Quoique cet appareillage ne soit pas aussi précis qu'un histophotomètre, il peut cependant donner une idée approximative de l'intensité de la réaction.

EFFET DE LA TEMPERATURE

Cori et ses collaborateurs, dans leurs travaux, ont démontré que la phosphorylase présente une activité considérable à 26°C, et même à une température assez éloignée de la température optima qui elle, se situe, en général, à 37°C. Et dans une autre étude (Madsen et Cori 1954) il a été signalé que l'activité de la phosphorylase peut être décelée même à 0°C.

Ceci nous a paru intéressant, et nous avons voulu étudier le comportement de ce système enzymatique sous l'influence de la température.

Pour l'étude de la température, le milieu d'incubation est porté préalablement à des températures échelonnées entre 0°C et 58°C. Les coupes sont introduites dans le milieu seulement au moment où la température est équilibrée au degré désiré.

Les résultats sont résumés dans le graphique n° 15. Dans le muscle et dans le foie du rat, ainsi que du cobaye, le taux d'activité, à environ 0°C, est de 50%. Une légère activation est remarquée à 11°C. La courbe d'activité (fig. 15) du foie et du muscle reste strictement superposable entre 0° et 11°C. Il existe une différence de l'activité dans le foie et dans le muscle assez sensible entre 11° et 32°C. Dans le muscle, l'activation est beaucoup plus rapide et atteint son maximum à environ 20°C. Ce maximum n'est atteint dans le foie qu'entre 26° et 32°C. Cet aspect est constant quelle que soit l'espèce envisagée. La réaction est maxima entre des valeurs moyennes de 26° à 37°C. Il y a une chute brusque de l'activité entre 37 et 45°C. Le taux d'activité à 45°C est, en effet, plus faible qu'à 0°C. La diminution de l'activité entre 45° et 58°C est progressive. Mais à 58°C la réaction est à peine décelable. Il paraît que, malgré l'inactivation à 58°C, ce système enzymatique n'est pas détruit puisque la coupe déjà incubée à 58°C, est capable de montrer cette activité lorsqu'elle est remise en incubation à la température optimale. Ce phénomène contredit la constatation de Shapiro et Wertheimer (1943) à l'égard de la destruction de cette enzyme à 55°C. Goltz et ses collaborateurs (1959) ont étudié l'effet de la température sur la phosphorylase de la peau et ont trouvé des résultats identiques.

L'effet du pH

Dans cette recherche, nous avons voulu contrôler le comportement tant de la phosphorylase que de la phosphorylase kinase sous l'influence du pH.

Pour l'étude de l'effet du pH, la température est maintenue constante à 37°C. Le pH du milieu d'incubation est échelonné de pH 5,0 à pH 7,5 tamponné avec le tampnn acétate (0,2 M) de pH 5,0 à pH 6,0 et avec le tampon tris (maléate) de Gomori de pH 6,0 à pH 7,5. La suite des réactions est identique à celle préaédemment décrite et le temps d'incubation reste fixé à 30 minutes.

Cn obtient les réactions les plus intenses à pH 6,0, tant dans le muscle que dans le foie. A des pH plus bas, la chute de l'intensité de la réaction est très brusque. Une faible modification du pH au-dessous de 6,0 entraîne très vite une absence de la réaction du foie à un pH voisin de 5,7 et du muscle à pH 5,4. L'intensité de la réaction diminue progressivement au-dessus de pH 6,0 et c'est encore le foie qui est plus rapidement inactivé. Après pH 6,4, l'inactivation est plus évidente dans le foie que dans le muscle. A pH 7,0, l'activité est à peine décelable dans le foie. A ce pH, dans le muscle, la réaction est faible mais toujours présente. A pH 7,5, la réaction n'a jamais été démontrée dans le foie, tandis que dans le muscle, parfois une très faible réaction est décelée. Quand l'AMP est ajouté dans le milieu d'incubation, la réaction dans le muscle est décelée même au-dessous de pH 5,0. Une réaction, quoique faible, a été obtenue même à pH 3,4.

Takeuchi et Kuriaki (1955) ont aussi observé pour leur réaction histochimique un pH optimum entre pH 5,7 et 6,0.

INTERPRETATION

Il est intéressant de noter que le pH optimum obtenu par nous est différent du pH optimum obtenu par les biochimistes. Pour le muscle, l'optimum est atteint entre pH 6,5 et 6,9 (Cori, Cori et Green 1943). Dans le foie, pour Sutherland et Wosilait (1956) l'optimum est atteint à pH 6,4. Tandis que l'optimum observé par nous, tant dans le muscle que dans le foie est à pH 6,0. Takeuchi et Kuriaki, pour leur technique ont observé l'optimum entre pH 5,7 et 6,0.

L'activité phosphorylasique démontrée par l'activation de la phosphorylase kinase ne montre jamais cette réaction à pH 5,0. Par contre Takeuchi et Kuriaki (1955) ont observé une réaction phosphorylasique même à pH 4,0. En effet, nous avions aussi remarqué que la phosphorylase activée par l'AMP peut être démontrée même au dessous de pH 4,0. Ceci prouve que l'activité montrée par notre technique est due

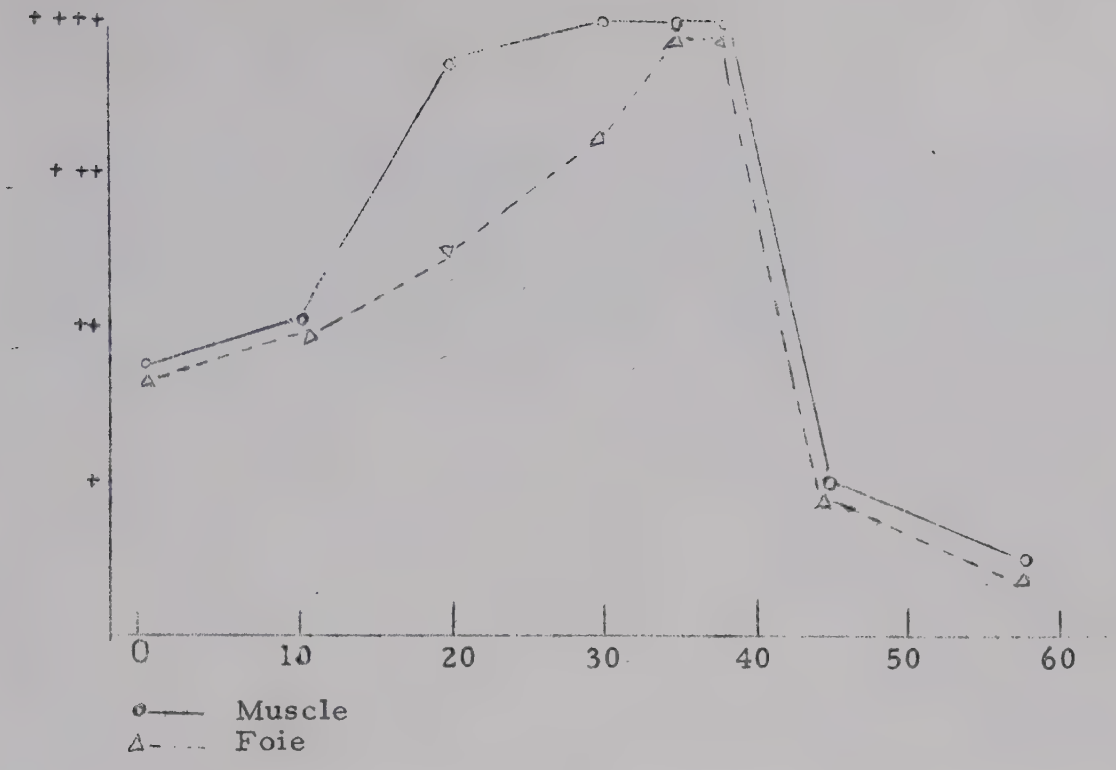


Fig. 15 - Effet de la température sur l'activité phosphorylasique.

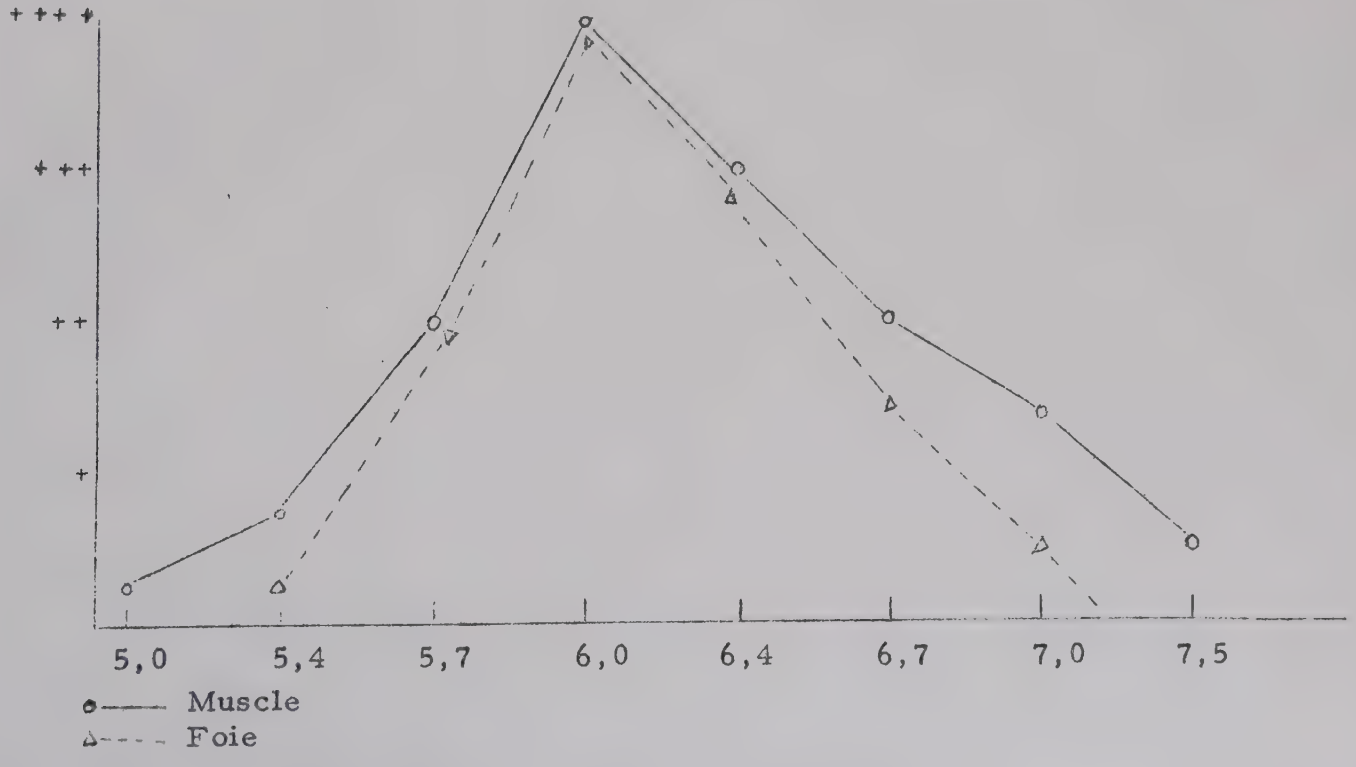


Fig. 16 - Effet du pH sur l'activité phosphorylasique .

à l'activation de la phosphorylase kinase et non à la dégradation de l'ATP en AMP, comme cela a été constaté par Takeuchi et Kuriaki. La chute brusque de l'activité au-dessous de pH 6,0 montre que la phosphorylase kinase est rapidement inactivée à des pH au-dessous de 6,0, et cette inactivation, à son tour, empêche la transformation de la phosphorylase inactive en forme active.

Chapitre VI

EFFETS DES FIXATEURS SUR LA CONSERVATION DE L'ACTIVITE PHOSPHORYLASIQUE

La réaction de la phosphorylase est réalisée sur des coupes des tissus frais non-fixés et coupés au cryostat. Comme depuis le début des études histoenzymologiques le problème de la fixation a intéressé énormément les histochimistes, nous avons également recherché l'effet des fixateurs sur la conservation topochimique de la phosphorylase.

En général les recherches effectuées sur ce sujet sont peu nombreuses. On peut citer parmi les travaux importants, ceux de Seligman, Chausney et Nachlas (1951) sur les phosphatases acides et alkalines, l'esterase, la sulfatase et la β glucuronidase, ceux de Baker, Hew et Fishmann (1958) sur les phosphatases acides et alkaline, sur les esterases et la glucuronidase, celui de Burstone (1958) sur les enzymes hydrolytiques en général.

Mais aucun de ces travaux n'a été consacré aux enzymes de transfert. Seul Takeuchi et Kuriaki (1955), les auteurs d'une technique précédente, ont signalé que la phosphorylase est détruite par l'acétone et par le formol. Cependant Takeuchi et Kinoshita (1956) avaient trouvé que l'activité phosphorylasique dans les cellules de sang reste conservée lorsque les frottis ont subi une courte fixation au méthanol.

La conservation de l'activité du système phosphorylasique pose des problèmes rien que par elle-même. Pour démontrer cette activité il faut considérer trois facteurs importants comme essentiels pour l'activité totale de la phosphorylase. Ce sont :

1) la phosphorylase (forme active préexistante et la forme inactive),

2) l'enzyme de transformation de la phosphorylase inactive,

3) le glycogène endogène des coupes qui sert comme "primer".

Si le nombre de fixateurs pour les réactions histologiques et pour les réactions histochimiques non-enzymatiques est très grand, pour les études histoenzymologiques le choix des fixateurs est très limité. Seuls les fixateurs inertes tels que l'alcool et l'acétone et quelques variantes du formol peuvent être employés.

MATERIEL ET TECHNIQUE

Nos études ont porté sur le muscle, le foie, le cerveau des animaux du laboratoire. En plus nous avons étudié l'effet des fixateurs sur les coupes du rein, de la surrénale et de l'ovaire du lapin. Les conditions de la mise en évidence de la phosphorylase étant identiques, le temps d'incubation a varié entre une demi-heure et deux heures.

Les fixateurs suivants ont été employés sur organes et sur coupes.

1) Acétone
2) Ethanol absolu
3) Ethanol 95%
4) Méthanol (pour les coupes fraîches seulement)
5) Les variantes de formol :
    a) Formol 10% (neutralisé à la craie)
    b) Formol salé de Baker
    c) Formol-calcium 10%
    d) Formol-chloryl hydraté (Baker et coll. 1958)
    e) Formol tamponné neutre

Le formol calcium a été préparé en ajoutant 1 g. de chlorure de calcium au formol 10% (100 cc); le formol-chloral hydraté a été préparé selon Baker, Hew et Fishmann (1958) en ajoutant 100 mg. de chloral hydraté à 100 cc de formol 10% et le formol tamponné en ajoutant 600 mg. de diphosphate de sodium et 450 mg. de monophosphate de sodium à 100 cc de formol 10%.

EXPERIENCES

Fixation en bloc (coupes à paraffine)

L'alcool (froid) 95% et l'acétone froid ont été employés comme fixateurs. La fixation dure 24 heures; les tissus fixés à l'acétone ont été deshydratés par l'acétone. L'inclusion dans la paraffine se fait classiquement à 56°C pendant deux heures et demie. Les coupes d'une épaisseur moyenne de 10 μ sont utilisées. Afin de mieux conserver le glycogène les coupes sont parfois étalées sur l'alcool à 70°.

Fixation en bloc (coupes à congélation)

Pour ce procédé, les morceaux de tissu sont fixés dans les différentes variantes de formol à la température de 4°C pendant quatre heures. Les coupes de 8 à 12 µ sont lavées très rapidement dans l'eau bidistillée avant d'être incubées.

RESULTATS

Après la fixation au formol et à l'alcool 95% plus aucune activité n'a pu être décelée au niveau des coupes provenant des tissus fixés en bloc.

Après la fixation à l'acétone, seulement quelques fibres musculaires ont conservé une très faible activité. Dans d'autres organes aucune trace d'activité n'est plus manifeste.

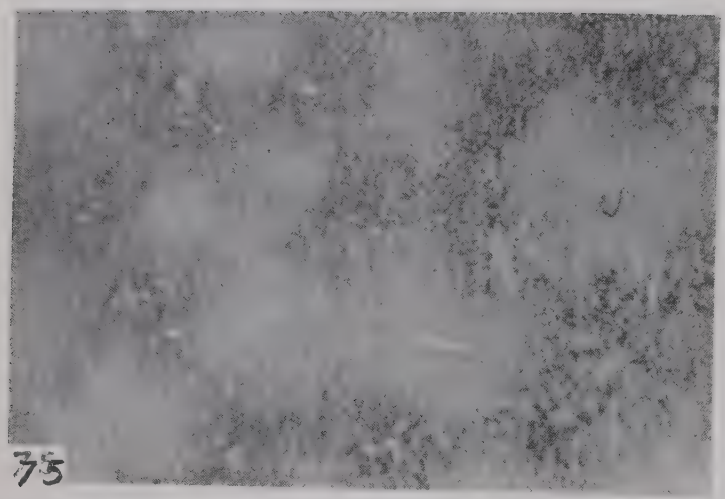
Après la fixation au formol tamponné, dans un seul cas l'activité a été assez intense. Mais, après conservation dans l'eau bidistillée, les coupes de ce même tissu n'ont plus montré aucune activité.

Fixation des coupes fraîches

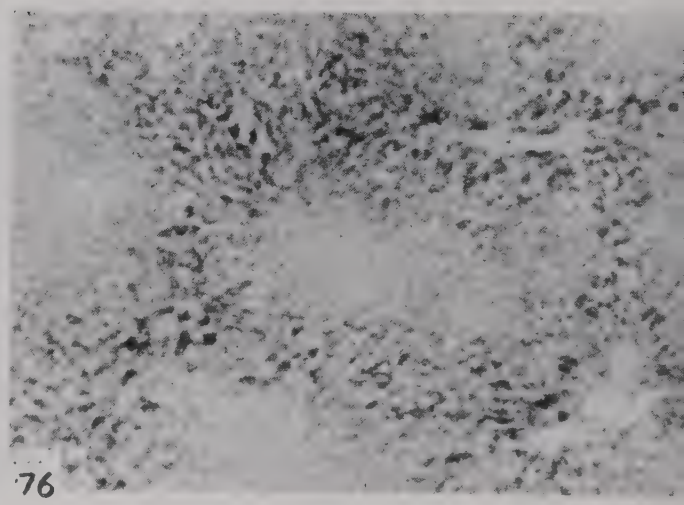
Les résultats dans les conditions indiquées étant négatifs, nous avons voulu contrôler le comportement de ce système enzymatique au cours des différentes étapes de la préparation de tissu pour les coupes à la paraffine. Cette étude a été réalisée en employant les coupes de tissu non-fixés et coupés au cryostat et ensuite en fixant les coupes dans les différents fixateurs. Cette méthode de post-fixation permet d'avoir un excellent aperçu sur le mode d'action des fixateurs et les agents employés pour l'inclusion de tissu en bloc.

Pour cette étude les mêmes fixateurs ont été employés mais la fixation était parachevée à 0°C. La fixation dure d'une demi-heure à 24 heures. Parfois les coupes restaient dans le fixateur pendant 72 heures. Les coupes fixées au formol ont été lavées à l'eau bidistillée avant l'incubation. Les coupes à l'acétone, à l'éthanol et à l'alcool méthylique ont été séchées à l'air pendant une demi-heure, puis les coupes étaient introduites directement dans le milieu d'incubation sans lavage préalable.

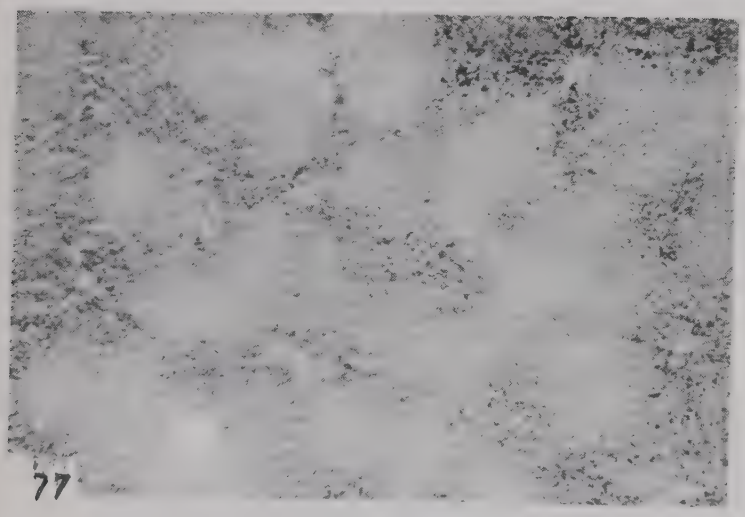
Les coupes fixées au formol (dans toutes les variantes) n'ont montré aucune activité. Par contre les divers organes fixés à l'acétone



75



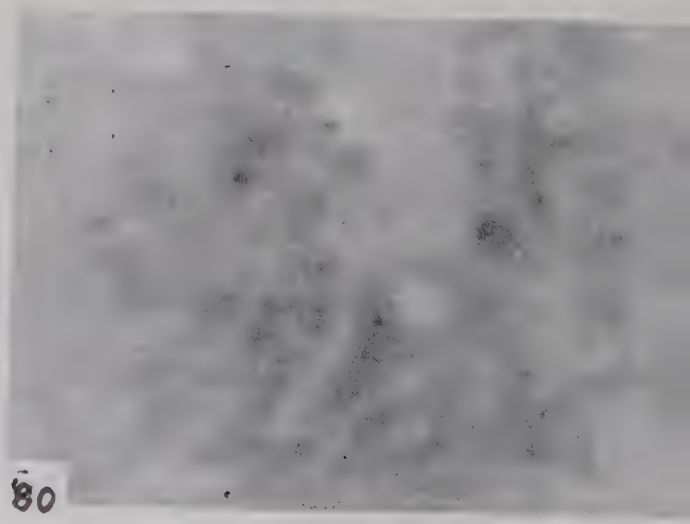
76



77

78

79



80

Effet des fixateurs

Figure 75 - Coupe non-fixée du foie de rat (Gr = 20 d)

Figure 76 - Même coupe en grossissement moyen montrant l'activité phosphorylasique dans le lobule (Gr = 60 d)

Figure 77 - Coupe successive du même foie fixée dans l'acétone.

Figure 78 - Même coupe de la figure 77, en grossissement moyen. L'activité dans la lobule est diminuée après la fixation.

Figure 79 - Coupe successive du même foie après la fixation à l'alcool. (Gr = 60 d)

Figure 80 - Même coupe à fort grossissement. Une coloration intense est remarquée au niveau des noyaux. La coloration est identique à celle de cytoplasme (Gr = 240 d)

et à l'alcool absolu conservent une activité considérable au niveau des coupes. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau IX

Coupe d'organe	Non fixée	Acétone	Alcool
Muscle	++++	++	++
Foie	++++	+++	++
Rein (Lapin)	++++	++++	+++
Ovaire (Lapin)	++++	+++	++
Surrénale (Lapin)	++++	+++	++
Cerveau	++++	±	——

++++ : activité intense
+++ : activité moyennement intense
++ : activité moyenne
+ : activité faible
± : activité très faible

D'après ce tableau, il est évident que pour tous les organes (sauf le cerveau) l'acétone, comme fixateur, est légèrement supérieur à l'éthanol. Mais pour le cerveau aucun des fixateurs n'a été trouvé satisfaisant.

Après la fixation pendant 72 heures à l'éthanol et à l'acétone, aucune diminution de l'activité par rapport aux coupes fixées pendant 4 heures n'a été remarquée.

La fixation prolongée au bout d'une heure au méthanol entraîne une disparition progressive de l'activité phosphorylasique.

Parfois, après la fixation à l'éthanol absolu et au méthanol, les coupes ont montré, après l'incubation pour la phosphorylase, une coloration à l'iode dans les noyaux des cellules périlobulaires du foie de rat. Dans une expérience, la réaction a disparu du cytoplasme des cellules normalement riches en phosphorylase mais la coloration était assez intense au niveau des noyaux de ces cellules (fig. 80).

En plus de l'effet des fixateurs sur l'activité, nous avons voulu contrôler l'étape de la disparition de l'activité au cours de l'inclusion.

La première étape consiste à traiter les coupes fixées à l'acétone ou l'alcool par le benzène. Les coupes fixées pendant 24 heures à 0°C

étaient introduites dans le benzène à la température ambiante

Le traitement dure une heure; les coupes étaient séchées à l'air pendant dix minutes. Ensuite elles étaient introduites dans le milieu d'incubation. Après l'incubation normale, l'activité a été décelée par la technique usuelle; une légère diminution de l'activité, par rapport aux coupes non traitées, a été observée. Mais l'activité est facilement décelable après cette étape.

La deuxième étape de ce contrôle était donc le traitement des coupes par la chaleur de 58°C, la température que le tissu doit subir pendant l'inclusion à la paraffine.

Le traitement des coupes consiste en la fixation de 24 heures; passage au benzène pour une heure, les faisant sécher après dans l'étuve à 58°C pendant deux heures.

Les coupes ainsi traitées n'ont montré qu'une légère diminution de l'activité par rapport aux coupes non traitées par la chaleur.

DISCUSSION

Les résultats exposés ci-dessus démontrent que ce système enzymatique est détruit totalement par le formol. La présence du chloral hydraté qui a été trouvé efficace pour conserver l'activité des phosphatases alcalines et acides, des estérases et la glucuronidase par Baker, Hew et Fishmann (1958) n'a pu améliorer la conservation de l'activité phosphorylasique. L'acidité du formol n'est pas la seule responsable de cette destruction puisque le formol neutre tamponné n'est non plus capable d'en conserver. Les ions de calcium (formol calcium) et les ions du phosphate (formol tamponné) ne modifient rien. Selon toute probabilité le formol par la fixation change la constitution moléculaire de la protéine de la phosphorylase.

Dans un seul cas, l'activité phosphorylasique a été observée même après la fixation au formol tamponné. Il est probable que cette réaction a été due à la non-pénétration du fixateur. Ceci est confirmé par le fait que les coupes du même tissu conservées à l'eau étaient négatives à la réaction.

Aucune activité n'a pu être décelée dans les coupes à paraffine. Les études ayant porté sur les coupes fraîches ont nettement démontré que la destruction de cette activité n'était pas due aux fixateurs employés. Mais nos études sur les coupes fraîches n'ont pu révéler non plus l'étape précise de la destruction de cette enzyme. Il est bien évident que la destruction de cette enzyme est seulement partielle après le

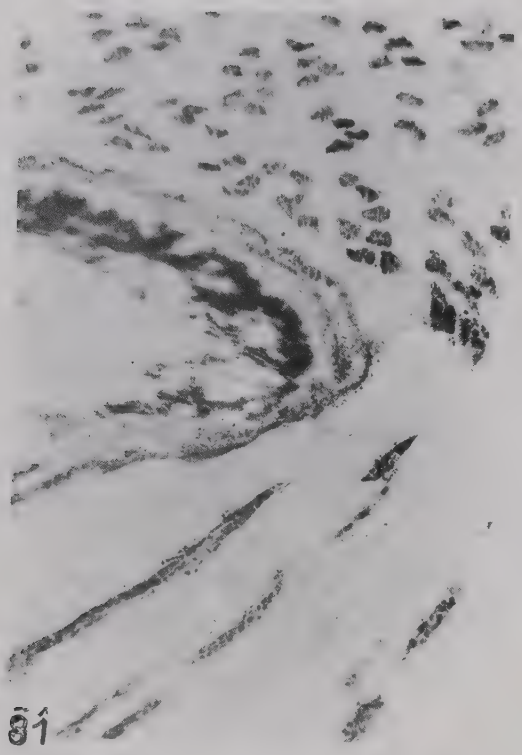


Fig. 1

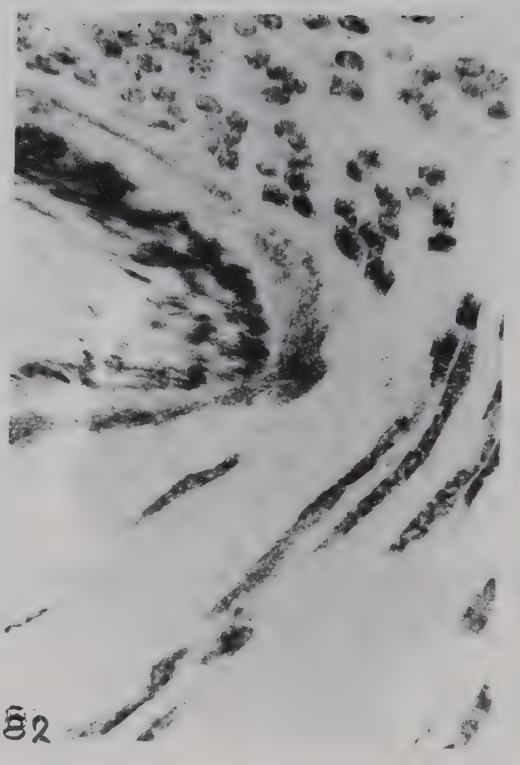


Fig. 2

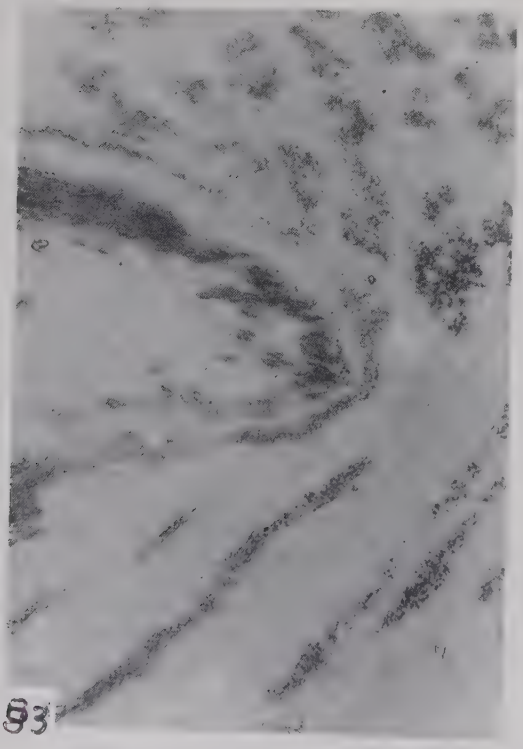


Fig. 3

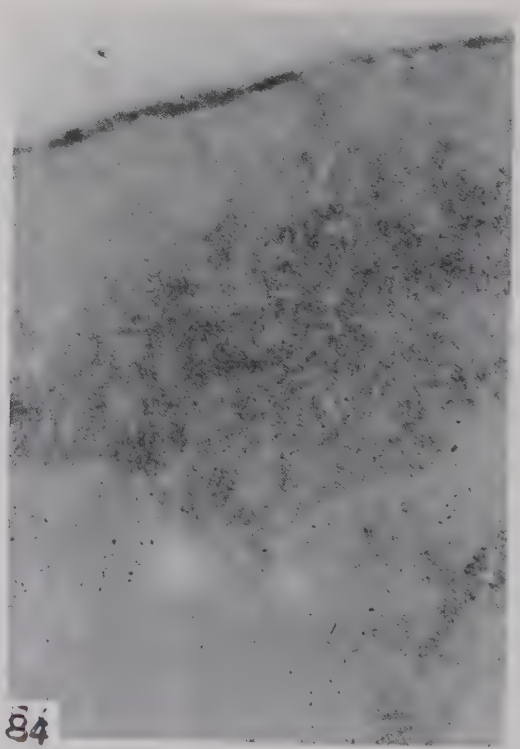


Fig. 4

Effet des fixateurs

Figure 81 - Coupe non-fixée du rein de lapin. L'activité est présente dans les tubes collecteurs et dans la couche musculaire du calice (Gr = 20 d)

Figure 82 - Coupe successive du même rein après la fixation dans l'acétone (Gr = 20 d)

Figure 83 - Coupe successive du même rein fixée à l'alcool absolu (Gr = 20 d)

Figure 84 - Coupe de la surrénale de lapin; fixation à l'acétone pendant 24 heures. L'activité est présente dans la cloison conjonctive et dans la fasciculée (Gr = 60 d)

traitement par les fixateurs et par le solvant organique comme le benzène. Dans un travail antérieur on a remarqué que cette enzyme n'est pas détruite même à 58°C. (Wegmann et Guha 1959). Ce fait est appuyé par nos études sur les coupes post-fixées. Tenant compte de ces faits, il paraît que la destruction de ce système enzymatique ne s'effectue pas même pendant l'inclusion à la paraffine. Il est donc probable que cette activité est détruite pendant le déparaffinage des coupes, mais nous ne pouvons pas apporter une preuve précise pour étayer cette hypothèse.

Takeuchi et Kinoshita (1956) ont observé la conservation de la phosphorylase dans les cellules du sang après une courte fixation au méthanol. Mais dans quelques essais nous avons remarqué que cette enzyme est détruite lorsque la fixation au méthanol est prolongée. La réactivité des noyaux observée après la fixation à l'alcool absolu n'a pas une explication nette. D'après nos études de la phosphorylase sur la fraction nucléaire, il nous paraît que cette activité n'est qu'un artéfact dû au traitement par éthanol.

CHAPITRE VII

ETUDES HISTOCHIMIQUES SUR "BRANCHING ENZYME"

Le "branching factor" de Cori et Cori (1943) qui transforme les liaisons α 1,4 en liaisons α 1,6 a été étudié par Larner (1953) en employant le glucose-1-phosphate marqué au carbone (C^{14}) de la fraction glucosidique. Par cette étude, le transfert des chaînes amylosiques extérieures du glycogène dans les chaînes intérieures a été démontré.

Takeuchi (1958), se basant sur les données de Cori et Cori ainsi que celles de Larner, arriva à la conception que, dans les conditions histochimiques, le polysaccharide synthétisé par la phosphorylase seule se colorait en bleu par l'iode, tandis que le polysaccharide synthétisé par la phosphorylase et la transglycosylase (l'enzyme branchante) se colorait en violet-rougeâtre ou en brun-pourpre. Sugino (1957) et Ellis et Montagna (1958) arrivèrent à une conception identique, de manière indépendante. Puis Takeuchi (1958) étudia de façon approfondie le problème de la mise en évidence de l'enzyme branchante au niveau des coupes des organes. Selon cet auteur, le polysaccharide synthétisé par la phosphorylase seule (bleu à l'iode) est digéré complètement par l'amylase β tandis que le polysaccharide synthétisé par la transglycosylase (brun-pourpre à l'iode) est digéré complètement par l'amylase α et non par l'amylase β . De plus, cet auteur a remarqué que l'enzyme branchante est complètement inhibée par l'alcool 20% et par le chlorure de mercure mercurique (10^{-4}M) tandis que l'inhibition de la phosphorylase est seulement partielle. Il a trouvé que le sulfate de zinc (10^{-4} M), le chlorure d'or (10^{-3} M) et l'acide phosphotungstique (10^{-4} M) inhibent considérablement l'enzyme branchante alors que l'inhibition de la phosphorylase est faible.

Les précédents auteurs n'ont pu démontrer de manière certaine que l'activité de l'enzyme branchante dépend entièrement de l'activité phosphorylasique. En effet, l'activité de la transglycosylase, du moins pour l'enzyme branchante du foie, ne peut se manifester qu'à partir du moment où la phosphorylase a synthétisé des chaînes amylosiques d'une longueur suffisante, comprise entre 11 et 21 unités glucosidiques.

Nous avons repris les expériences réalisées par Takeuchi, afin de contrôler si effectivement on peut mettre en évidence l'intervention de l'enzyme branchante sous-jacente à l'activité phosphorylasique. Dans nos recherches,

nous avions déjà remarqué que la phosphorylase est fortement inhibée lorsque le sulfate de magnésium est remplacé par le sulfate de zinc ou par le chlorure mercurique ($2,5 \times 10^{-3}$ M). L'inhibition par les sels de métaux lourds est encore évidente même à 10^{-4} M. Dans ces conditions, nous admettons que l'action inhibitrice de ces métaux lourds sur l'enzyme branchante relève d'une action indirecte. Ces métaux lourds, par leur action inhibitrice sur la phosphorylase empêchent la synthèse des chaînes amylosiques qui sont nécessaires pour que l'enzyme branchante puisse se manifester.

L'alcool (20% par volume) a été ajouté au milieu d'incubation destiné à caractériser la phosphorylase totale. Mais l'inhibition de la transglycosylase n'a pu être prouvée. Dans le foie du rat et du lapin, le glycogène synthétisé simultanément par la phosphorylase et par la transglycosylase se colore en brun à l'iode. Mais cette coloration n'a été ni empêchée ni transformée en bleu par l'addition d'éthanol (20 %).

Nous avons également employé la technique de post-digestion par les amylases α et β . Les solutions des amylases ont été préparées comme suit :

La solution des amylases :

Amylase α ou β cristallisée	10 mg
Solution de ClNa M/25	2 cc
Tampon phosphate (pH 6,9) ou acétate 0,1 M	2 cc
Eau bidistillée	6 cc

La solution de l'amylase β à pH 5,3 a été préparée par le tampon acétate. La solution témoin a été préparée par la suppression des amylases α et β .

Les coupes fraîches ont été incubées dans le milieu de la phosphorylase totale. Après l'indubation, les coupes ont été fixées dans l'alcool absolu pendant une heure. Puis les coupes ont été réhydratées. Chaque étape a été faite sur 4 coupes faites en série montées sur les lamelles séparées (la technique est identique à celle de Takeuchi).

Les coupes ont subi les traitements suivants :

a) La première coupe est traitée par la solution de Lugol pour colorer le polysaccharide synthétisé ; cette coupe sert de témoin.

Phosphorylase hépatique

Figure 17 - L'activité phosphorylasique dans le foie de rat. Réaction est limitée dans la région périlobulaire (Gr = 60 d)

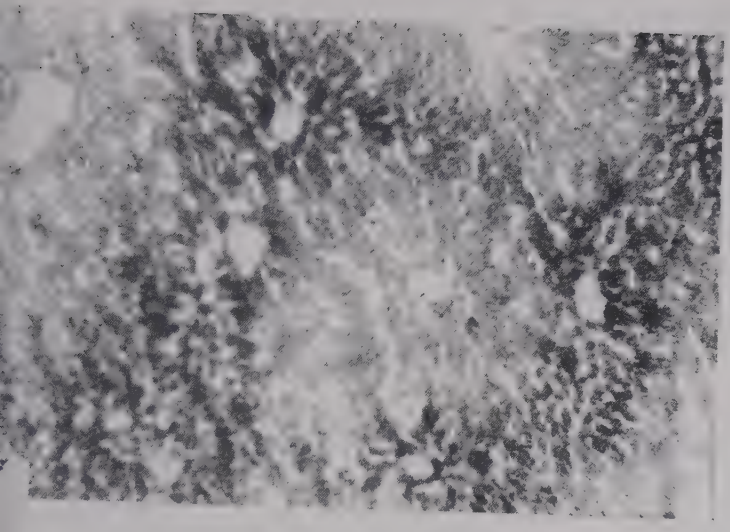
Figure 18 - Région périlobulaire du foie de rat. L'activité est absente dans les noyaux (Gr : 240 d)

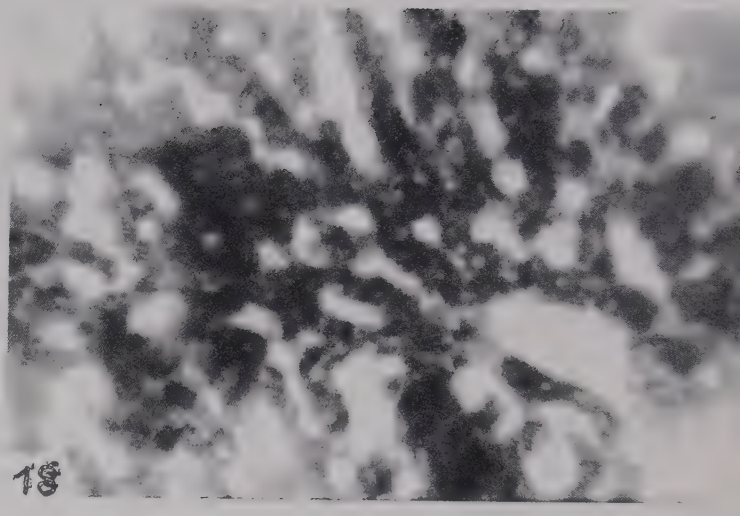
Fig. 19 - Phosphorylase dans le foie normal de l'homme. L'activité est présente dans le lobule entier (Gr = 60 d)

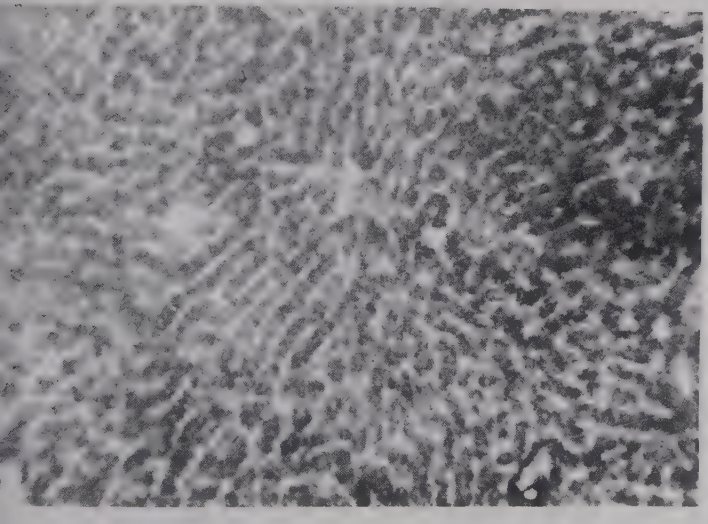
Fig. 20 - Fort grossissement de la même coupe (Gr = 60 d)

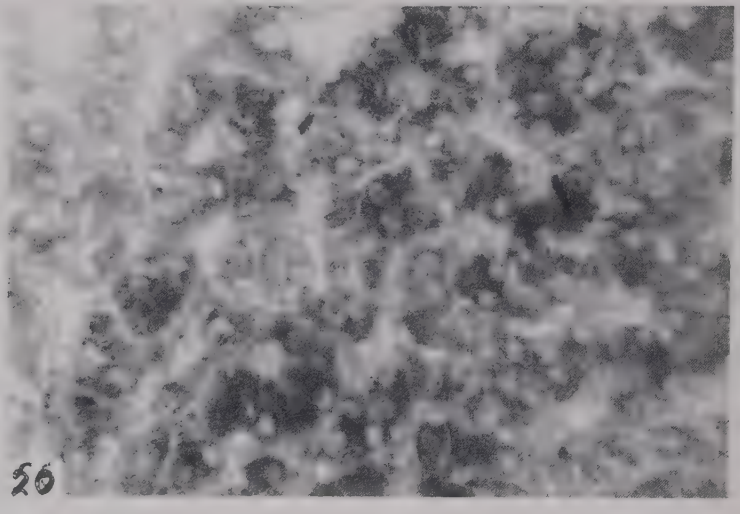
Figure 21 - Foie de lapin démontrant l'activité dans la région centrolobulaire (Gr = 240 d)

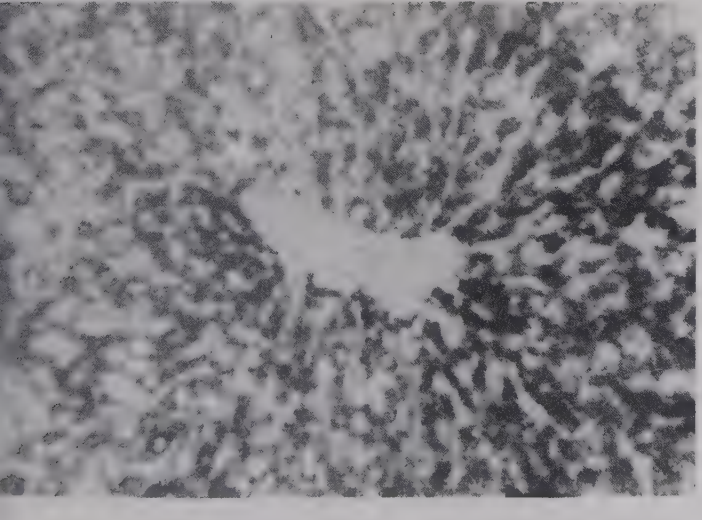
Fig. 22 - L'activité phosphorylasique dans l'épithélium du canal biliaire du foie de lapin (Gr = 320 d)

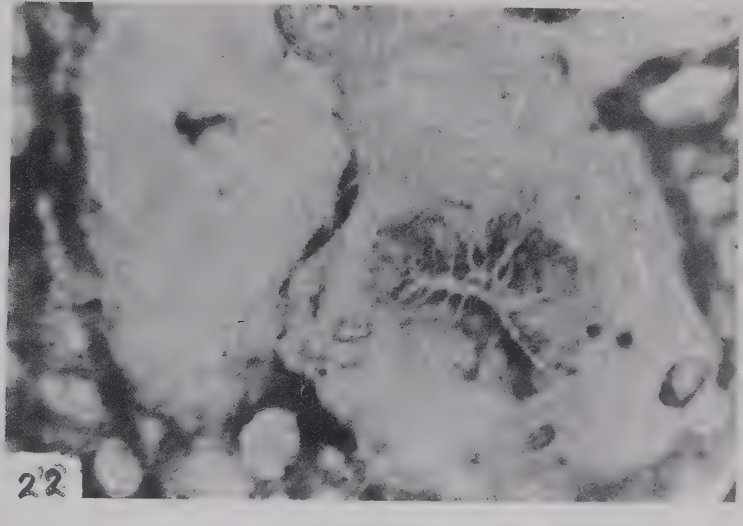



18




20




22

Chapitre VIII

DISTRIBUTION DE LA PHOSPHORYLASE DANS LES ORGANES

FOIE

L'activité de la phosphorylase dans le foie de rat, de cobaye, de lapin, de chien et de l'homme (matériel de biopsie) a été étudié.

Chez le rat, l'activité est limitée aux cellules de la zone périlobulaire. Les cellules autour de l'espace de Kiernan montrent une activité intense. Les cellules des travées présentent rarement une activité. La paroi des artères et des artérioles et des veines réagit parfois (fig. 63). Parmi les 150 rats étudiés, à peu près une douzaine d'entre eux n'a montré qu'une activité très faible. Elle était parfois absente. La raison de cette diminution de l'activité chez ces animaux apparemment normaux n'a pas été trouvée. La charge glycogénique du foie de ces animaux était normale.

Chez le cobaye tous les animaux étudiés ont montré une activité au niveau de la zone périlobulaire. Parfois l'activité s'étend dans le lobule tout entier. Même dans ces cas, l'activité des cellules périlobulaires reste la plus intense. La paroi vasculaire est fortement positive.

Chez le lapin, la réaction est également intense dans le lobule entier (fig. 21). C'est la couche musculaire de la paroi vasculaire qui représente l'activité la plus intense.

Chez ces trois animaux (le rat, le cobaye et le lapin) l'activité phosphorylasique se caractérise par une coloration brune. Une post-digestion par la β amylase a démontré l'intervention de l'enzyme branchante ou "branching-enzyme" dans la synthèse du glycogène par la phosphorylase.

Chez le chien, la réaction se traduit par une coloration bleue dans la totalité du lobule. L'activité de l'enzyme branchant n'a pas été étudiée.

L'activité de la phosphorylase est intense dans le lobule de foie de l'Homme (fig. 19) : elle est intense dans la couche musculaire de la paroi vasculaire de même que dans la couche musculaire du canal biliaire.

Souvent une activité de la phosphorylase active préexistante est observée chez le lapin et chez l'Homme.

Takeuchi, Higasi et Watanuki (1955) ont trouvé une réaction inconstante chez le lapin. Selon ces auteurs, la réaction est modérée chez le chien et chez l'Homme. Tamada (1958), employant la technique de Takeuchi et Kuriaki, n'a pu obtenir de réactions chez le rat.

La couche musculaire des canaux biliaires est légèrement positive. Une activité dans la villosité de l'épithélium est rarement présente (fig. 22).

Wegmann et Quenum (1960) ont recherché la phosphorylase chez les rats alcoolisés. Ils n'ont trouvé aucune modification de cette activité.

Godlewski et Fenar (1961) ont trouvé une diminution de la phosphorylase hépatique chez les souris portant les tumeurs.

REIN

Chez le cobaye, diverses régions de tubes du cortex montrent une activité assez intense. Ces régions tubulaires sont surtout représentées par la partie distale du tube contourné et par la partie ascendante du tube de Henle (fig. 24). Les canaux collecteurs montrent une très légère activité. Takeuchi et ses collaborateurs (1955b) n'ont pu l'obtenir chez le cobaye.

Chez le lapin, les canaux collecteurs dans la médullaire montrent une réaction très intense, qui se manifeste par une coloration violette ou bleue. Takeuchi (1958) avait déjà constaté cette activité. La couche musculaire des vaisseaux de cobaye et de lapin et la couche musculaire de bassinet de tous animaux étudiés présentent cette activité (fig. 81).

Mac Pherson et Pearse (1957) prétendent avoir trouvé une réaction chez le rat dans les canaux collecteurs, dans la partie distale des tubes contournés et dans une autre série de canaux dans le médullaire. De plus, ils ont remarqué une activité dans l'épithélium de la papille. Mais ni Takeuchi et ses collaborateurs (1955b), en employant la technique de Takeuchi et Kuriaki, ni nous-même, en employant soit la technique de Cuha et Wegmann soit celle de Takeuchi et Kuriaki n'ont pu obtenir la moindre activité chez le rat adulte. Il est probable que cette réaction ait été obtenue chez des rats d'une autre souche. Nous signalons que les rats nouveaux-nés révèlent une activité dans les tubes collecteurs, qui disparaît quelques jours après la naissance. Tenant compte de ce fait on peut considérer que l'absence de cette activité phosphorylasique chez le rat est due à une évolution secondaire dans cette souche de rat.

Fig. 23.- Rein de lapin. L'activité est présente dans les tubes collecteurs (Gr = 240 d)

Fig. 24.- Rein de cobaye; l'activité dans les tubes ascendants de Henle et dans un autre tube.

Fig. 25.- Vessie de cobaye. L'activité est intense dans l'épithélium pavimentaux et dans la couche mus culaire.

Fig. 26.- Cvaire de lapin; l'activité dans la couche germinative.

Fig. 27.- Cvaire de lapin; l'activité dans la thècque externe des follicules.

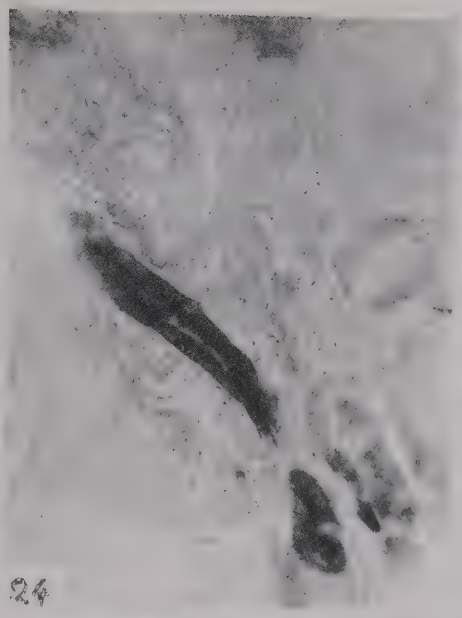
Fig. 28.- Vagin de rat. L'activité est présente dans les couches musculaires. L'activité est parfois présente dans l'épithelium stratifié de vagin.

Fig. 29.- Phosphorylase active préexistante dans le myomètre. Coupe transversale de l'utérus de rat (Gr = 80 d)

Fig. 30.- Phosphorylase totale dans la coupe successive du même utérus (Gr = 80 d)

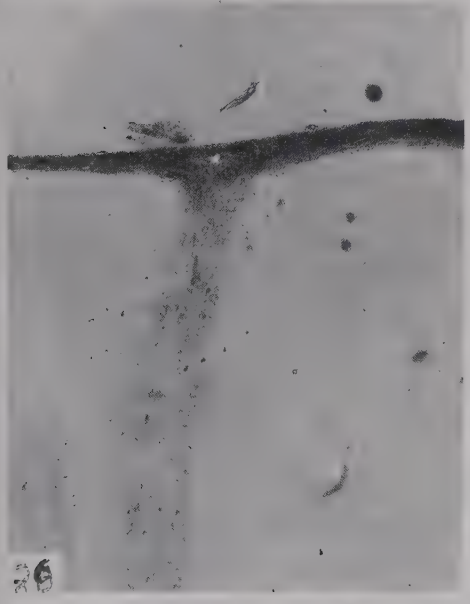
Fig. 31.- Utérus de rat; coupe longitudinale.
L'activité est intense dans le myomètre et modérée dans la paroi vasculaire.

23

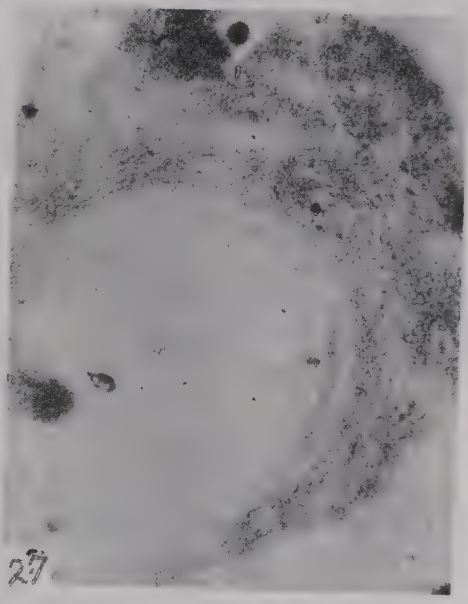


24

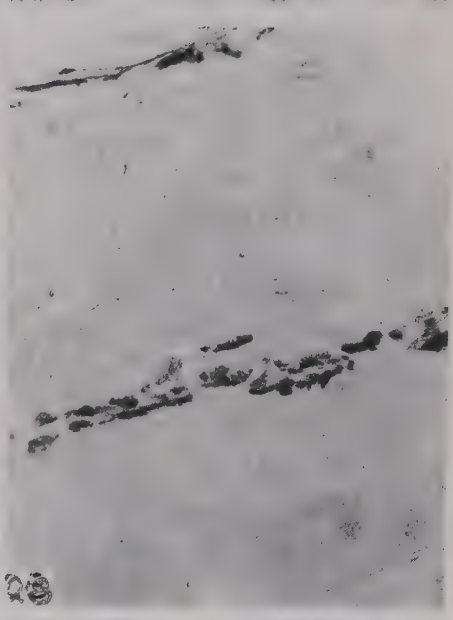
25



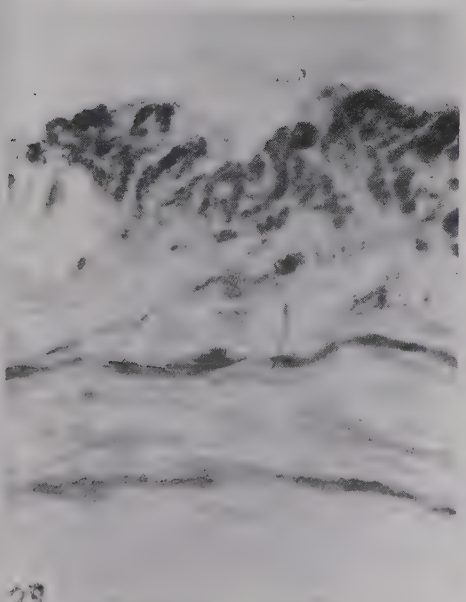
26



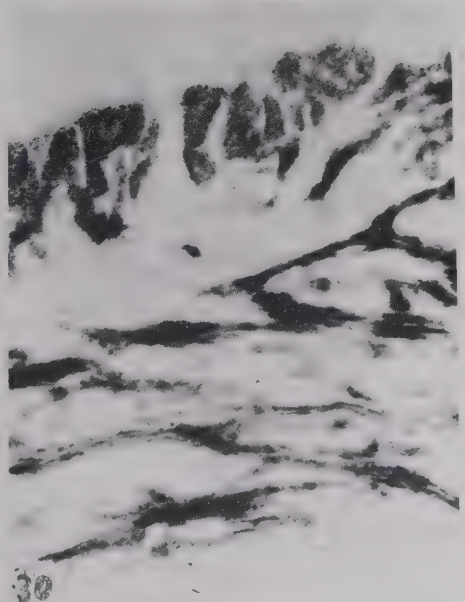
27



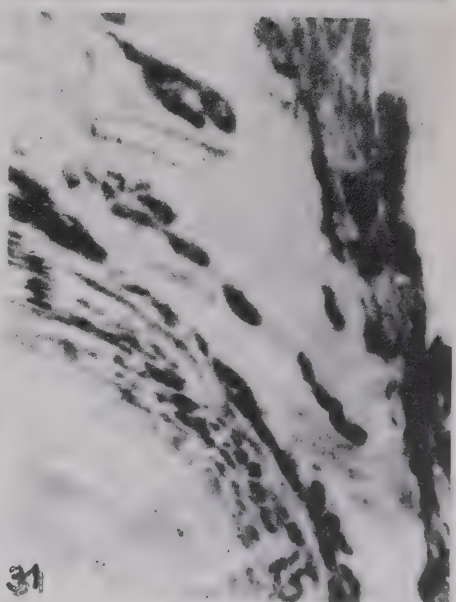
28



29



30



31

UTERUS

Chez le rat et chez le lapin les couches musculaires présentent une activité intense. L'activité est la plus intense dans les couches externes. La couche musculaire des vaisseaux est modérément positive. Les cobayes n'ont montré aucune activité dans les couches musculaires. L'épithélium de l'endomètre montre parfois une légère activité chez le rat et chez le lapin. Cette activité dans l'endomètre est plus ou moins constante chez le cobaye.

Chez le rat, parfois une activité se manifeste dans quelques cellules dispersées dans l'endomètre.

Takeuchi, Higashi et Watanuki (1955) tout d'abord n'ont pu obtenir une réaction phosphorylasique dans l'utérus du rat et du lapin. Mais plus tard, Takeuchi (1958) a remarqué chez le lapin une réaction intense dans le myomètre, plus particulièrement pendant la grossesse. Contrairement à la constatation de Takeuchi et ses collaborateurs, nous avons obtenu une réaction légère dans le myomètre du rat, même en employant la technique de Takeuchi et Kuriaki (1955). Mais l'activité est plus intense lorsque la technique de Guha et Wegmann est employée.

Herbener et Atkinson (1959), employant la technique de Takeuchi et Kuriaki (légèrement modifiée), ont obtenu une réaction intense ou modérée dans le myomètre et une activité faible et irrégulière dans l'épithélium de l'endomètre. De plus, ils ont constaté que la déposition du glycogène provoquée par l'administration de l'œstrogène n'est pas due à l'augmentation du taux de la phosphorylase.

Bo (1959) a recherché la distribution de la phosphorylase chez le rat au cours du cycle œstral et des rats traités par les hormones. Il a constaté que la réaction est la plus forte pendant le proestrus et la moins intense pendant le dioestrus. Contrairement à la constatation de Herbener et Atkinson (1959), il a constaté une augmentation de l'activité phosphorylasique après administration d'oestrogène et de l'oestrogène et de la progesterone associées. La progestérone seule n'entraîne aucune augmentation de l'activité phosphorylasique.

De plus, aucun de ces auteurs n'a signalé une réaction dans les cellules dispersées dans l'endomètre, comme nous l'avons remarqué. Selon Bo, les cellules chargées du glycogène dans l'endomètre, observées pour la première fois par Rosenbaum et Goolsby (1957) sont des leucocytes neutrophiles. Il nous paraît probable que les cellues observées par Rosenbaum et Goolsby et par Bo sont les mêmes que celles qui ont montré une réaction phosphorylasique par notre technique.

Chez les rattes, pendant la grossesse, la réaction est limitée à la couche musculaire externe. La seule forme de la phosphorylase pendant

la grossesse est la forme active. Aucune augmentation de l'activité de la phosphorylase totale n'a été remarquée.

Chez la poule, dans l'oviducte à l'état de repos, l'activité phosphorylasique est nette dans la couche musculaire de tous les quatre segments (l'infundibule, le secteur albugène, l'isthme et l'utérus) et dans le vagin. Cette activité est assez variable depuis une activité modérée jusqu'à une activité très intense. La phosphorylase, à l'état de repos, est présente surtout sous la forme inactive. La paroi vasculaire de cet organe révèle une activité intense.

Chez la poule en ponte, l'activité phosphorylasique est très intense dans les couches musculaires de tous les quatre segments et une activité intense se manifeste dans l'épithélium de l'infundibule, de l'isthme et de l'utérus. L'activité phosphorylasique dans le muscle et dans l'épithélium du vagin est aussi très intense. L'apparition de la phosphorylase dans l'épithélium est remarquée chez la poule en ponte seulement. Dans cet état de l'oviducte, la forme prédominante de la phosphorylase est la forme active et dans le segment qui contient l'oeuf, au moment de sacrifice, la phosphorylase est présente uniquement sous la forme active. L'augmentation de la phosphorylase totale est aussi remarquable (Diculesco, Thèse, Doctorat d'Université).

PEAU

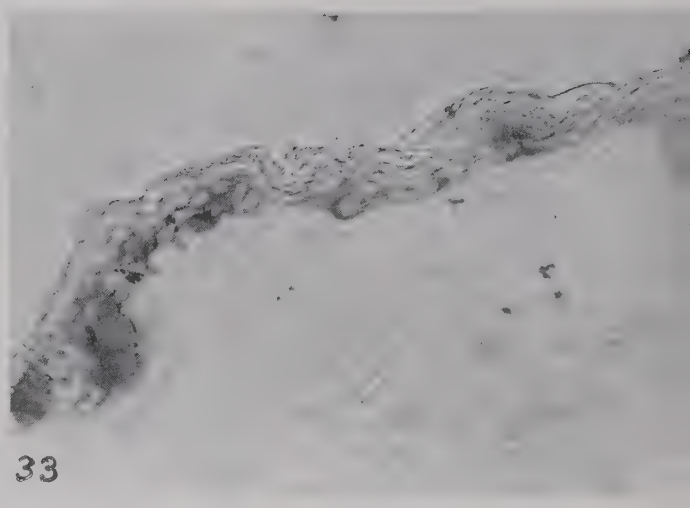
Chez le rat, chez le cobaye, et chez le lapin la couche de Malpighi montre une activité nette. La réaction est absente dans le stratum granulosum et dans le stratum corneum. La gaine épithéliale externe des follicules de poils montre une activité intense (fig. 35). Une faible activité a pu être décelée dans la glande sébacée, sauf chez le rat. La réaction dans la couche de Malpighi est démontrée après une incubation prolongée.

Ellis et Montagna (1958) n'ont pu déceler une activité phosphorylasique dans les divers éléments de la peau des animaux de laboratoire. Par contre, Takeuchi (1958) a constaté la présence d'une activité phosphorylasique dans les follicules de poil et dans les glandes sébacées de lapin.

L'activité phosphorylasique de la peau humaine a été étudiée d'une façon approfondie par Braun-Falco (1956a et 1956b) par Ellis et Montagna (1958) et par nous-mêmes (1961).

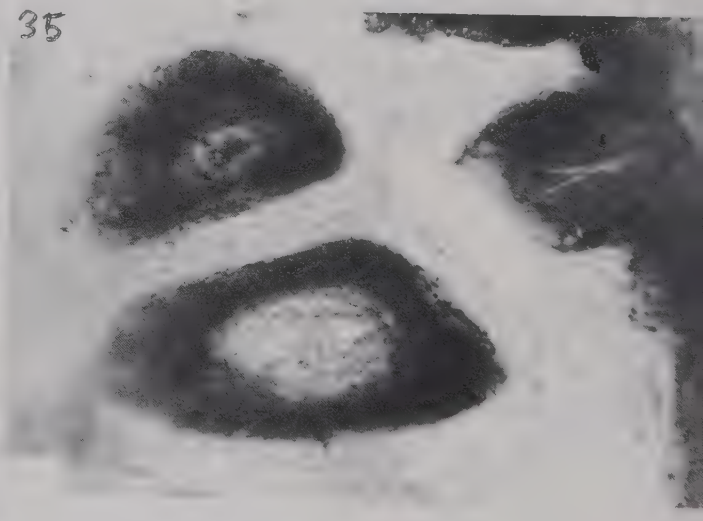
Braun-Falco a mis en évidence la réaction dans toutes les couches de l'épiderme, excepté dans le stratum corneum. Il a constaté une réaction intense dans le follicule de cheveu, dans les glandes sudori-

32



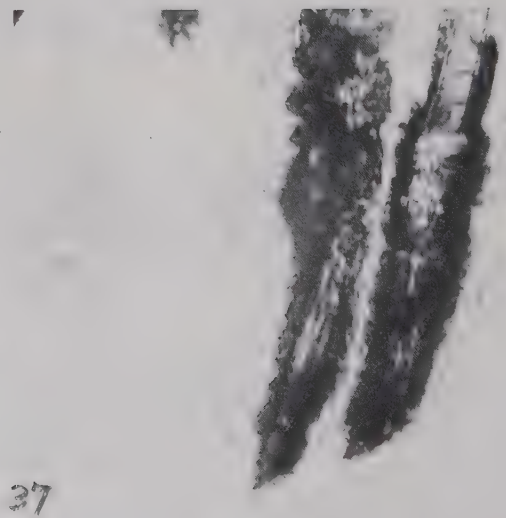
33

34



35

36



37

Figure 32 - Peau de rat. L'activité est présente dans l'épiderme, dans la gaine folliculaire et dans la couche musculaire (Gr = 60 d).

Figure 33 - Epiderme de rat; l'activité phosphorylasique dans l'assise basale (Gr = 240 d).

Figure 34 - Peau de cobaye. L'activité dans la gaine folliculaire, dans le muscle arrecteur, dans la glande sudoripare et dans la paroi vasculaire (Gr = 80 d)

Figure 35 - Peau de cobaye. L'activité est présente dans la gaine folliculaire et dans l'épiderme (Gr = 240 d)

Figure 36 - Peau de lapin; l'activité est présente dans la gaine folliculaire et dans l'épiderme (Gr = 240 d)

Figure 37 - Follicule de la peau de lapin. L'activité est intense dans la gaine folliculaire (Gr = 240 d)

pares et dans les cellules périphériques de la glande sébacée. Selon cet auteur, les cellules basales qui sont normalement dépourvues de glycogène, montrent aussi une activité phosphorylasique.

Ellis et Montagna (1958) ont remarqué l'activité intense du stratum spinosum et une faible activité dans l'assise basilaire. Dans les glandes sudoripares (eccrines) le glomérule est très riche en phosphorylase. Le segment intradermique du canal excréteur de ces glandes montre une activité faible tandis que le segment intra-épidermique est riche en phosphorylase. La partie terminale des glandes apocrines est riche en phosphorylase et les cellules mycépithéliales autour du glomérule de la glande apocrine sont légèrement positives. Les cellules périphériques des glandes sébacées ne présentent qu'une activité faible. Selon ces auteurs, les follicules contiennent une quantité considérable de phosphorylase. La gaine épithéliale externe du follicule de cheveu est riche en phosphorylase.

Yasuda, Furusawa et Cgata (1958) ont aussi recherché la phosphorylase dans les glandes sudoripares de l'aisselle de l'homme. Ils ont constaté que le segment sécréteur des glandes apocrines est dépourvu d'activité phosphorylasique. Seules les cellules basales des glandes eccrines se caractérisent par une activité intense. Les cellules qui bordent la lumière de la glande sudoripare sont totalement dépourvues de phosphorylase.

Ellis et Montagna (1959) ont aussi étudié la répartition de la phosphorylase dans les glandes sudoripares des singes et ils ont trouvé que la répartition est identique à celle de l'homme.

Les auteurs qui ont recherché la phosphorylase dans la peau n'ont pu trouver aucun rapport entre l'activité phosphorylasique et la concentration du glycogène cutané.

La phosphorylase de la peau humaine (matériel de biopsie) de diverses régions du corps a fait l'objet de notre recherche. La peau de la nuque, de la joue, de l'avant-bras, de scrotum et du ventre a été utilisée pour notre recherche.

Phosphorylase totale

L'activité a été observée dans le glomérule de la glande sudoripare. Mais aucune différence d'activité des cellules basales et des cellules bordant la lumière n'a été remarquée. Le glomérule de la glande apocrine est dépourvue d'activité phosphorylasique. L'activité est très intense dans la glande eccrine. Cette activité se manifeste par une coloration bleue foncée (fig. 42 et 43).

Le canal excréteur intradermique de la glande eccrine est négatif, tandis que la partie intra-épidermique montre une réaction brune à l'iode. Cette réaction est identique à celle de l'épiderme.

Les cellules périphériques de la glande sébacée montrent une activité modérée (fig. 41).

La gaine épithéliale externe du follicule du poil est très riche en phosphorylase (fig. 45).

La couche basale et le stratum spinosum montrent une activité faible de la phosphorylase. Cette activité se manifeste par une coloration brune (fig. 39 et 41). Parfois cette activité s'étend dans la couche granuleuse et dans la couche lucide. Mais dans ces dernières couches l'activité est très faible.

Ces résultats, en somme confirment les résultats obtenus par Braun-Falco (1956) et par Ellis et Montagna (1958).

Dans aucun de ces organites nous n'avons jamais obtenu une coloration brune ou bleue par une simple coloration par la solution de Lugol.

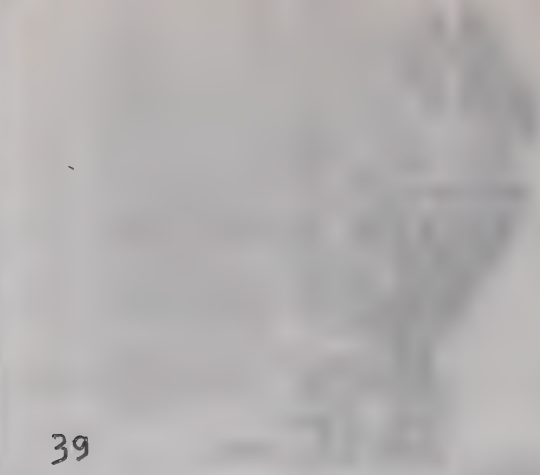
Phosphorylase active

L'activité de cette forme de la phosphorylase est extrêmement variable dans les différents éléments cutanés. Dans l'épiderme cette forme est souvent la forme prédominante tandis que dans la gaine folliculaire l'activité de cette forme varie entre une absence totale et une activité presque aussi intense que la phosphorylase totale (fig. 44 et 45). Cette variation de l'équilibre entre la phosphorylase active et la forme inactive est observée même dans la peau normale. Dans le glomérule de la glande sudoripare, l'activité de cette forme phosphorylasique est faible ou absente.

"Branching enzyme"

L'activité de cette transglycosylase (l'enzyme branchante) a été étudiée par une post-digestion par la β -amylase selon la technique de Takeuchi (1958) ou par une post-digestion par la phosphorylase. Si une réaction persiste dans un élément cutané, cela signifie l'intervention de l'enzyme branchante. La réaction dans l'épiderme est la première à disparaitre par cette post-digestion. Ceci indique, contrairement à la constatation d'Ellis et Montagna (1958), la non-intervention de l'enzyme branchante dans la synthèse du polysaccharide dans l'épiderme. La réaction est absente même dans la glande sébacée. Seule dans la gaine folliculaire et dans le glomérule de la glande eccrine une réaction persiste, indiquant une intervention de "branching enzyme". D'après nos observations, on peut arriver à la conclusion que l'intervention de l'enzyme branchante ne peut pas être interprétée par la coloration à l'iode. La disparition complète de la coloration brune de l'épiderme après une post-digestion par la β -amylase indique que l'enzyme branchante ne se manifeste toujours pas avec une coloration brune à l'iode.

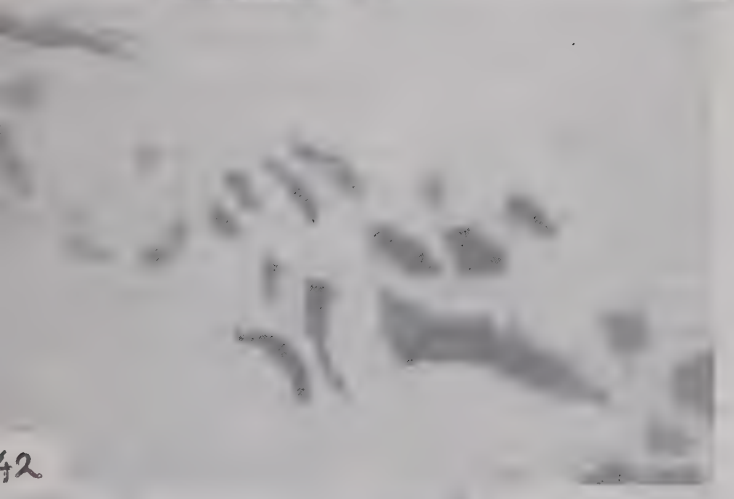
38



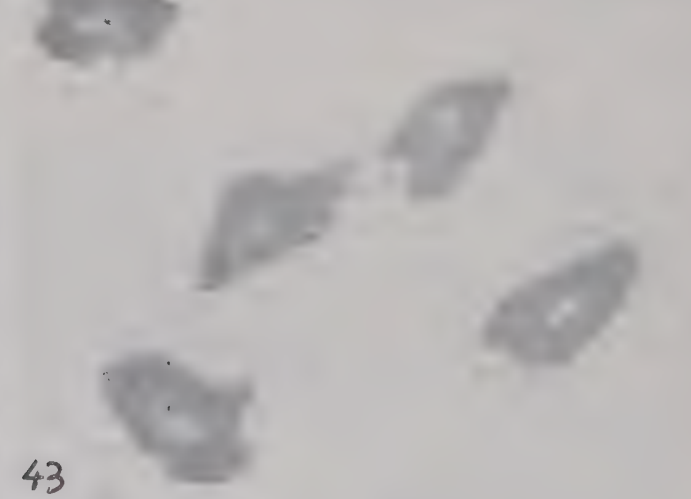
39

40

41



42



43

44

45

Phosphorylase de la peau humaine

Figure 38 - Epiderme de la peau normale (Gr = 80 d)

Figure 39 - Assise basale de la peau humaine. L'activité est plus intense dans le pôle basal que dans le pôle apical (Gr = 320 d)

Figure 40 - L'activité phosphorylasique dans le stratum spinosam (Gr = 320 d)

Figure 41 - Glande sébacée. L'activité est présente dans les cellules périphériques (Gr = 320 d)

Figure 42 - Glande sudoripare; faible grossissement (Gr = 60 d)

Figure 43 - Glande sudoripare; fort grossissement (Gr = 340 d)

Figure 44 - Phosphorylase active préexistante dans la gaine folliculaire de poil (Gr = 60 d)

Figure 45 - Phosphorylase totale dans la coupe successive du même tissu (Gr = 60 d)

Rapport avec le glycogène

Tous les auteurs (Braun-Falco 1956a, Ellis et Montagna 1958, Goltz et coll. 1959) qui ont étudié l'activité phosphorylasique de la peau, sont arrivés à la conclusion qu'il n'y a aucun rapport entre l'activité phosphorylasique et la concentration du glycogène dans les divers éléments cutanés. Ces auteurs ont employé la technique de Takeuchi et Kuriaki (1955) qui ne permet que de déceler l'activité de la phosphorylase totale. Or, si l'on considère que le rôle de la phosphorylase in vivo est de dégrader le glycogène endogène, en ce cas la diminution du glycogène de tissu doit être réalisée par un changement d'équilibre des deux formes de la phosphorylase en faveur de la phosphorylase active. Cette augmentation de la phosphorylase active n'entraîne pas nécessairement une augmentation de la phosphorylase totale.

Le peu d'études que nous avons faites à ce sujet jusqu'à maintenant ne nous permet pas de conclure d'une manière absolue, mais les résultats déjà obtenus nous laissent présumer que la diminution du glycogène dans ce tissu est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylase active tandis que la phosphorylase totale reste souvent inchangée. Mais la disparition totale du glycogène dans l'élément cutané peut entraîner une inhibition des deux formes de la phosphorylase tant active qu'inactive.

En somme, nos résultats indiquent clairement que le rapport inverse entre la concentration du glycogène et l'activité de la phosphorylase active peut être obtenu dans la peau.

MUSCLE SQUELETTIQUE

Le muscle droit de la cuisse (rectus femoris), le muscle abdominal, et le diaphragme sont les muscles les plus étudiés. La réaction phosphorylasique dans ce genre de muscle se manifeste par une coloration bleue. L'activité est intense dans les fibres entières. Parfois quelques fibres se colorent en rouge. Lorsque la coloration est moins intense, la réaction se voit limitée aux myofibrilles et aux stries transversales. Dans les coupes transversales le "champ de Cohnheim" est bien dessiné par la réaction (fig. 47).

Dans le diaphragme, parfois un certain nombre de fibres ne montre pas cette activité. La raison de cette absence n'est pas bien compréhensible.

Dans le muscle droit de la cuisse souvent une réaction faible de la phosphorylase active préexistante est remarquée. Mais cette phosphorylase active peut être produite par la stimulation du muscle pendant le prélèvement.

L'intervention de l'enzyme branchante ou l'amylo transglycosylase est presque nulle dans le muscle. Lorsque les coupes incubées sont soumises à une post-digestion par la β-amylase, la coloration à l'iode disparaît presque complètement.

Takeuchi et ses collaborateurs (1955a, 1955b, 1958) ont constaté la réaction identique de la phosphorylase totale et de l'enzyme branchante dans le muscle.

Dubowitz et Pearse (1960a, b) ont étudié l'activité de la phosphorylase musculaire dans les cas pathologiques (central-core disease) et ils ont trouvé un rapport inverse de l'activité de cette enzyme avec la succinodeshydrogénase.

MYOCARDE

Les fibres musculaires sont riches en activité phosphorylasique chez le rat, chez le cobaye et chez le lapin. L'activité est plus constante dans le muscle des oreillettes que dans le muscle du ventricule. Cette activité se manifeste par une coloration violette ou bleue. Les artères coronaires montrent une coloration assez intense (fig. 48 et 49).

Nos observations confirment la constatation de Takeuchi, Higashi et Watanuki (1955) qui sont arrivés aux mêmes résultats en employant la technique de Takeuchi et Kuriaki.

APPAREIL GENITAL, PLACENTA, GLANDE MAMMAIRE

Testicule

L'activité est présente uniquement dans la couche musculaire de la paroi des artérioles. La membrane basale des canaux séminipares, les cellules de Sertoli et les spermatides sont totalement dépourvus de cette activité.

Dans l'épididyme, la tunique musculaire lisse montre une légère activité.

Ovaire

Chez le rat et chez le cobaye seule la couche musculaire des artères et des artérioles montre une réaction. Chez le lapin la couche

Figure 46 - Muscle strié de l'œsophage de rat. La réaction est intense dans les stries transversales (coupe longitudinale) (Gr = 320 d)

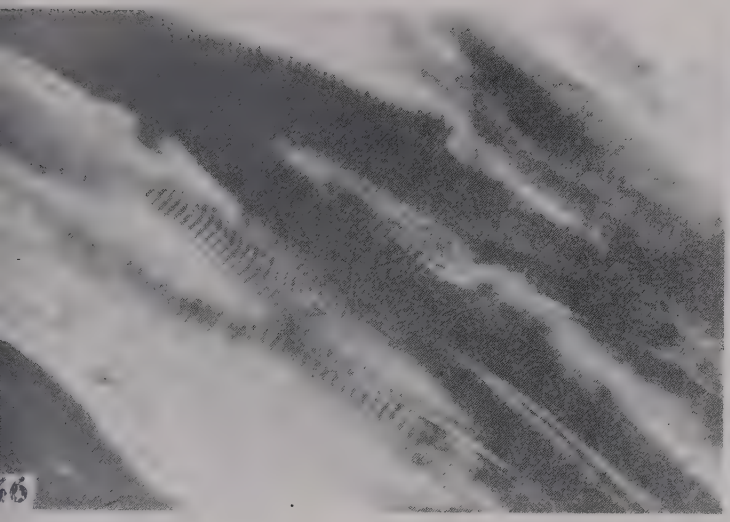
Figure 47 - Coupe transversale du muscle droit de cuisse de rat. La réaction est très intense dans le champ de Cohnheim (Gr = 240 d)

Figure 48 - Myocarde de rat.

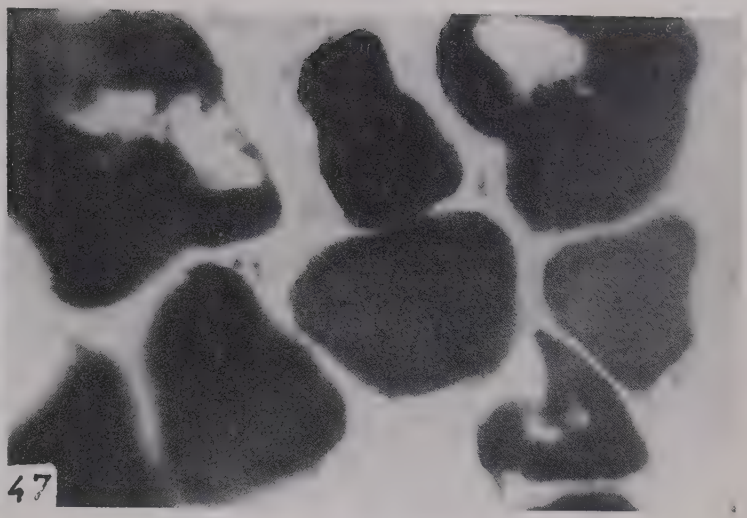
Figure 49 - Myocarde de cobaye

Figure 50 - Coupe longitudinale du tendon d'Achille; région tendino-cartilagineuse. L'activité est présente dans les chondrocytes.

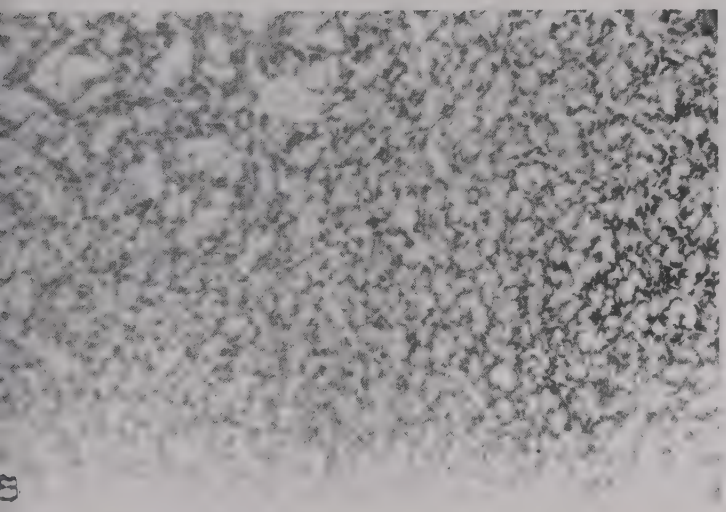
Figure 51 - Région musculo-tendineuse de la même coupe. Une réaction diffuse est présente dans le tissu tendineux.



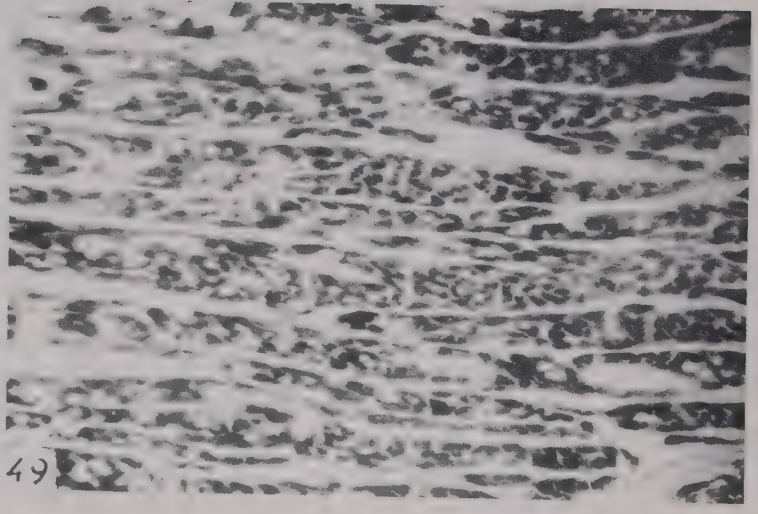
46



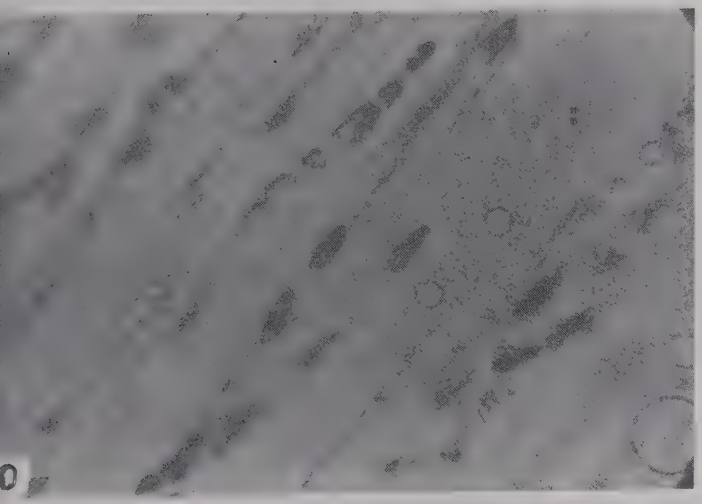
47



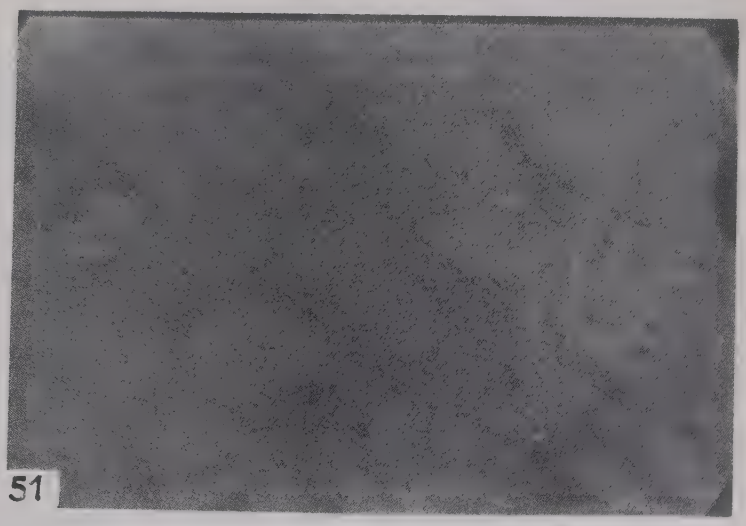
48



49



50



51

germinative a une activité intense. Le stroma ensemble montre une activité modérée et la couche interne de la thèque externe des follicules montre une activité faible.

Vagin

La couche musculaire montre une activité intense. L'épithélium stratifié montre une activité modérée ou intense. Mais l'activité de cet épithélium est variable.(fig. 28).

Placenta

Le placenta du rat blanc au troizième et au dix-neuvième jour de la grossesse a fait l'objet de notre étude. Aucune activité dans ces deux séries de placentas n'a pu être décelée. D'après ces observations, il paraît que la phosphorylase ne joue aucun rôle dans la synthèse et dans la dégradation du glycogène placentaire.

Glande mammaire

Chez le rat, chez le cobaye et chez le lapin adultes, l'épithélium des canaux galactophores est riche en phosphorylase. Le tégument externe avec ses glandes montre une activité intense.

Selon Takeuchi (1959) l'activité dans l'épithélium augmente pendant la grossesse et la lactation.

Fanger et Barker (1960) ont recherché la phosphorylase dans la glande mammaire humaine. L'activité est plus intense dans les canaux galactophores. L'élément myoépithélial des canaux interlobulaires montre une activité modérée.

APPAREIL DIGESTIF

Glandes salivaires

Seules les glandes sous-maxillaires montrent une réaction au niveau des cellules des canaux sécréteurs. Cette activité est également présente dans la lumière de ces canaux (fig. 54). Il est difficile de savoir si cette activité phosphorylasique dans la lumière est due à une diffusion ou si cette enzyme est vraiment présente dans la salive.

Œsophage

La réaction est légèrement positive dans l'épithélium stratifié tandis que les couches musculaires (couche longitudinale, couche circulaire et la muscularis mucosae) l'activité est très intense (fig. 58).

Takeuchi, Higashi et Watanuki (1955b) ont constaté l'activité dans les mêmes niveaux.

L'estomac et l'intestin

La réaction est limitée aux couches musculaires. Mais l'activité de la phosphorylase est très irrégulière dans ces organes.

Rectum

La phosphorylase est présente dans les couches musculaires et dans la muscularis mucosae. Une légère activité est décelée dans l'épithélium après une incubation prolongée (fig. 59).

Pancréas

L'activité est totalement absente dans les acini et dans les ilôts de Langerhans du pancréas de rat, de cobaye, de lapin et de l'homme.

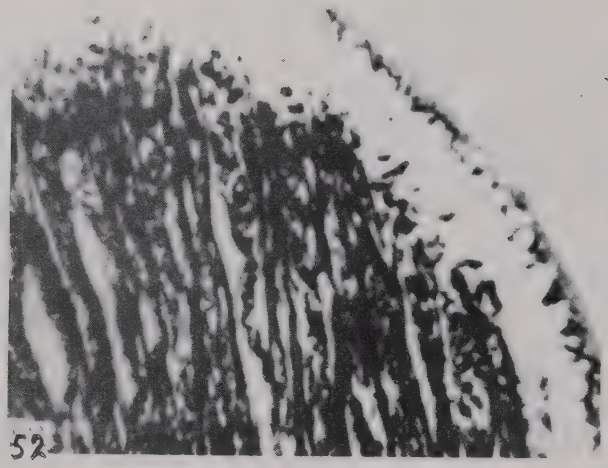
Gésier de la poule : L'activité est presque totalement négative dans la couche musculaire du gésier de la poule.

SYSTEME ENDOCRINIEN

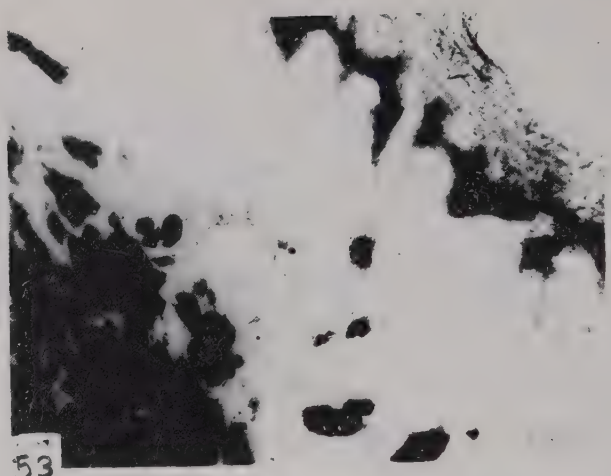
Hypophyse : L'activité est absente (Takeuchi 1958).

Thyroïde

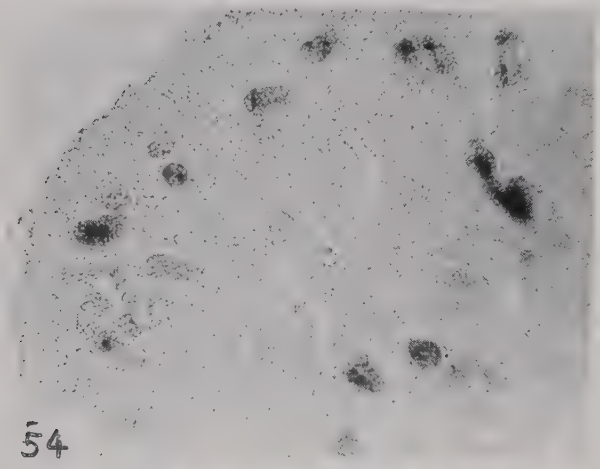
Une seule fois nous avons obtenu une réaction dans l'épithélium de la thyroïde apparemment à l'état hyperactif d'un rat. Mais cette réaction n'a jamais été obtenue chez les autres animaux de la même espèce. Chez le lapin l'activité est présente dans la paroi vasculaire.



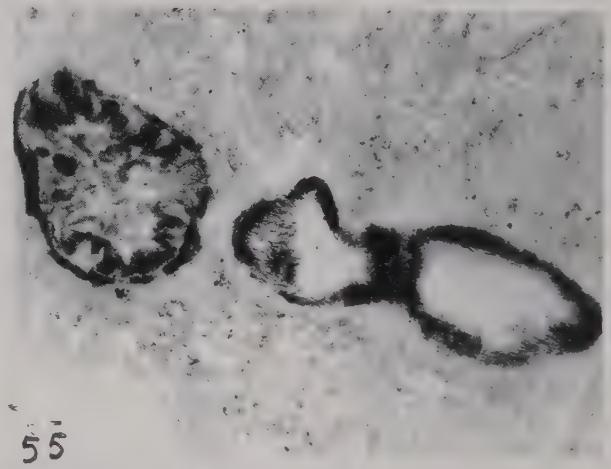
52



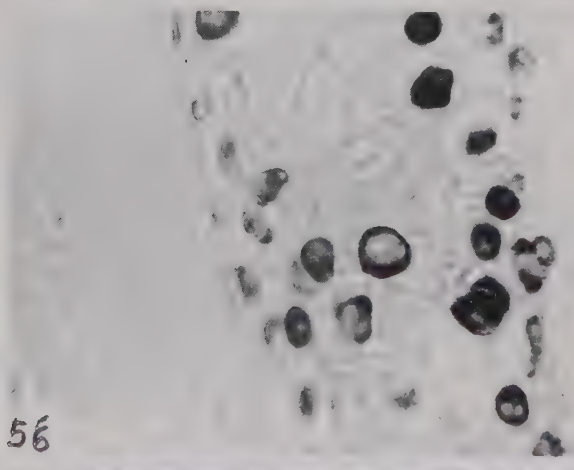
53



54

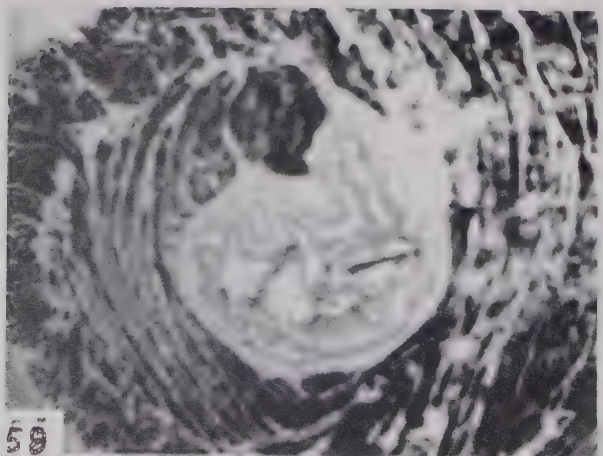


55

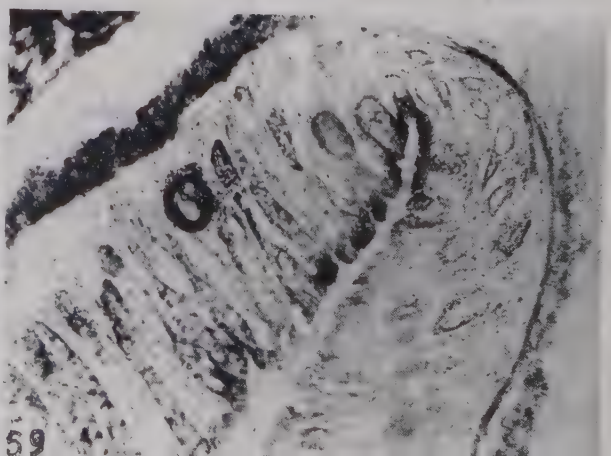


56

57



58



59

Figure 52 - Langue de lapin; faible grossissement. L'activité est présente dans les couches musculaires et dans l'épithélium malpighienne (Gr = 60 d)

Figure 53 - Langue de lapin; fort grossissement (Gr = 240 d)

Figure 54 - Glande sous-maxillaire de rat. L'activité est présente dans la lumière et dans les cellules des canaux excréteurs (Gr = 60 d)

Figure 55 - Poumon de rat; l'activité dans la couche musculaire de l'artère et de la bronche. L'épithélium de bronche est aussi faiblement positive (Gr = 80 d)

Figure 56 - Cartilage de la trachée. Un certain nombre de chondrocytes sont positives à la réaction (Gr = 240 d)

Figure 57 - Glande séreuse de la trachée montre une activité intense (Gr = 240 d)

Figure 58 - Œsophage de rat. L'activité est intense dans les couches musculaires (Gr = 60 d)

Figure 59 - Coupe de rectum de cobaye. L'activité est intense dans les couches musculaires et faible dans l'épithélium (Gr = 240 d)

Surrénale

Chez le cobaye la cloison conjonctive montre une activité intense mais variable. Chez le lapin, la cloison conjonctive et la fasciculée contiennent la phosphorylase (fig. 84).
Chez le rat une activité intense est présente dans certaines cellules médullaires. Mais cette activité est extrèmement variable.

DIVERS ORGANES

Glandes hardériennes

Cet organe est complètement dépourvu de l'activité phosphorylasique. Les cellules glandulaires et les canaux excréteurs sont totalement négatifs à la réaction.

Péritoine

Lorsque le péritoine étalé et non-fixé est soumis à une réaction phosphorylasique, une réaction diffuse est observée. L'activité est localisée à un certain nombre de cellules qui n'ont pas été identifiés.

Cerveau

Shimizu et Okada (1957) ont étudié la distribution de la phosphorylase dans le cerveau des rongeurs jeunes et adultes. Ces auteurs trouvent une activité intense dans la substance grise et dans la membrane arachnoïde. Une activité est observée dans les faisceaux de nerfs de l'écorce cérébrale. Dans le cervelet l'activité est intense dans la substance blanche, modérée dans la couche granuleuse chez les adultes. La couche moléculaire montre une activité assez intense. Hamuro (1957) a étudié la phosphorylase du cerveau sous l'influence de la blessure provoquée par l'agression externe. Friede (1959) a étudié l'activité phosphorylasique du cerveau de rat et de cobaye.

Langue

L'activité est très intense dans toutes les couches musculaires (fig. 52). L'activité est absente dans le tissu conjonctif. L'épithélium malpighienne montre une activité moins intense (fig. 53). Les bourgeons du goût ne montrent aucune activité.

Aorte

Dans l'aorte de rat et de lapin l'activité est limitée dans l'élément musculaire. Aucune activité n'a été observée dans l'adventice et dans l'intima. Takeuchi (1958) a constaté une activité intense dans l'aorte de lapin.

Tendon

Les tendons intermusculaires montrent rarement une activité faible. Dans le tendon d'Achille l'activité est présente sous forme des granulations diffuses près de la jonction musculo-tendineuse. Cette activité est irrégulière et aucune transition entre la réaction musculaire et la réaction tendineuse n'a été observée. Dans la région tendino-cartilagineuse du même tendon l'activité est intense dans les chondrocytes (fig. 50 et 51). Takeuchi (1958) n'a pas trouvé d'activité dans cet organe.

SYSTEME URINAIRE

La distribution de la phosphorylase dans le rein est décrite ailleurs. (page 88)

Uretère

Une activité modérée est toujours observée dans la couche musculaire de l'uretère de rat, de cobaye, et de lapin.

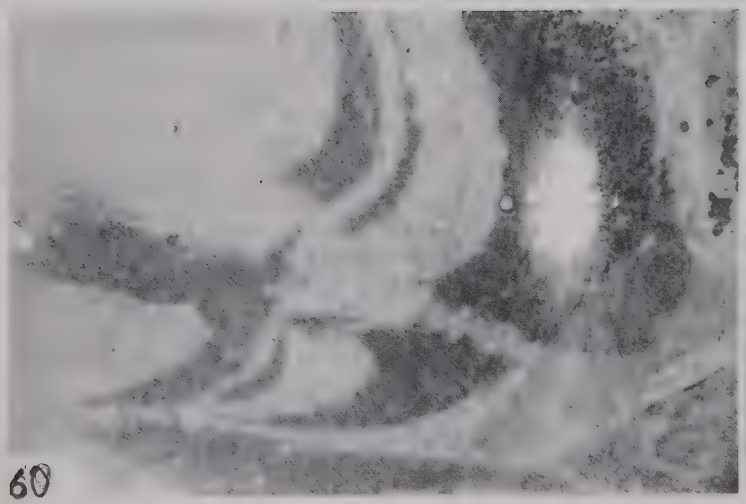
Vessie

L'activité phosphorylasique est présente dans l'épithélium pavimenteux de la vessie (fig. 25) de rat, de cobaye et de lapin. La couche musculaire également montre une activité.

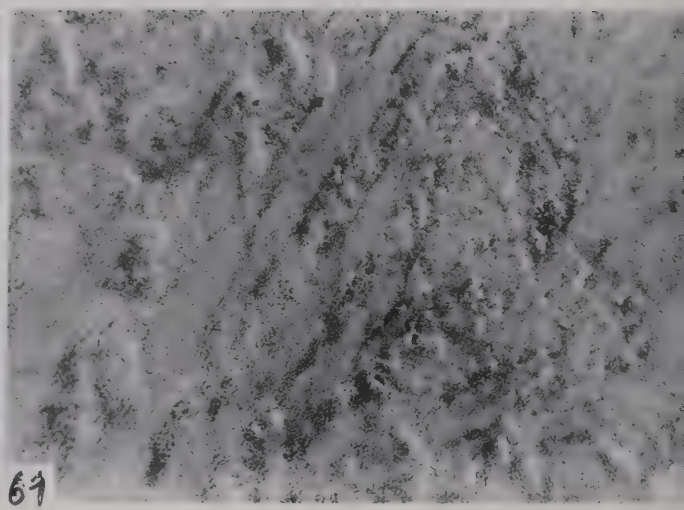
APPAREIL RESPIRATOIRE

Poumon

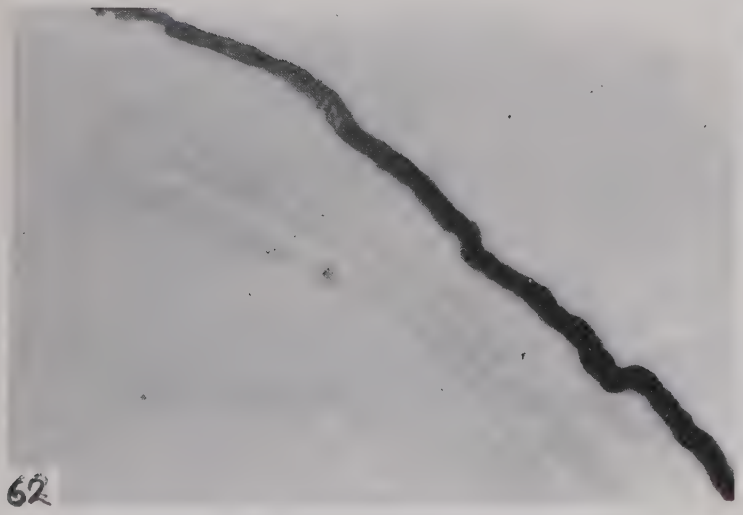
L'activité très intense est toujours présente dans la couche musculaire de la paroi vasculaire et dans la couche musculaire des bronches. L'épithélium des bronches (fig. 55) montre souvent une activité. Parfois



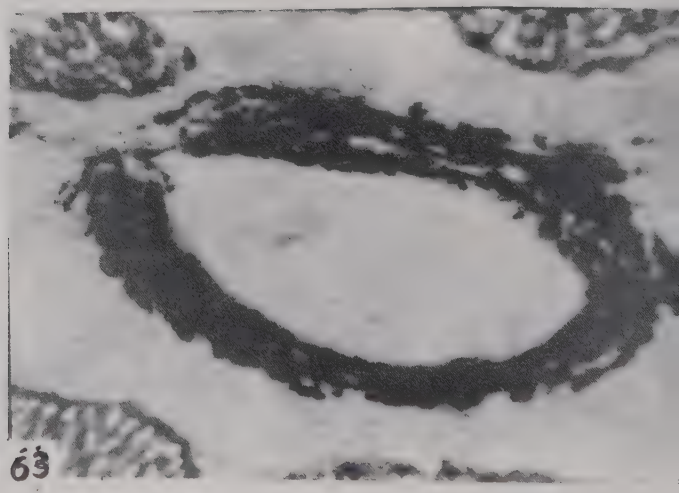
60



61



62



63

Figure 60 - Cerveau de rat; l'activité intense dans les commissures (Gr = 60 d)

Figure 61 - L'activité phosphorylasique dans les faisceaux de nerfs dans le cerveau (Gr = 80 d)

Figure 62 - Cornée de lapin. L'épithélium antérieur montre une activité intense.

Figure 63 - L'artère hépatique. L'activité est intense dans les fibres lisses de la tunique moyenne (Gr = 240 d)

une réaction est observée dans les jonctions alvéolaires. Il s'agit peut-être du support musculaire de l'alvéole.

Trachée

Les cartilages de la trachée montrent toujours une activité intense dans certains nombres de cellules (fig. 56). L'activité est absente dans l'épithélium et dans le tissu conjonctif. Parfois quelques glandes séreuses de la trachée montrent une activité intense (fig. 57).

CELLULES SANGUINES ET MOELLE OSSEUSE

Takeuchi et Kinoshita (1956) ont recherché la phosphorylase dans les cellules sanguines. Cette activité se manifeste par une coloration bleue ou bleue-violette dans les leucocytes neutrophiles, eosinophiles et pseudo eosinophiles de sang périphérique de l'homme, de chien, de lapin et de pigeon. La phosphorylase est également présente dans les leucocytes bicolores de serpent, de poisson et de grenouille.

Dans la moelle osseuse la réaction apparaît dans les leucocytes, neutrophiles, pseudoeosinophiles et dans les métamyélocytes, myélocytes et promyélocytes de la moelle osseuse de l'homme et de lapin (Takeuchi et Kinoshita).

CARTILAGE ET OS

Nous avons surtout étudié le cartilage xyphoïde et le cartilage de la trachée. Les cellules cartilagineuses sont très riches en phosphorylase. Les jeunes chondrocytes du cartilage montrent une activité très intense par une coloration bleue (fig. 56). Cette activité diminue progressivement dans les cellules âgées. Takeuchi et ses collaborateurs (1955b) ont trouvé la réaction identique.

Le fémur du rat nouveau-né fait l'objet de nos recherches phosphorylasiques. Contrairement à la constatation de Cobb (1953), nous n'avons trouvé aucune activité dans les cellules de tissus calcifiés. Takeuchi (1958) n'a pas trouvé d'activité phosphorylasique dans les cellules de l'os.

ORGANES DE SENS

Oeil

L'activité phosphorylasique est très intense dans l'épithélium stratifié de la cornée du rat, du cobaye et du lapin (fig. 62). L'activité

est absente dans le tissu conjonctif et l'épithélium postérieur de la cornée.

L'activité est totalement absente dans la rétine. Une activité faible et diffuse est observée dans le nerf optique. Le cristallin est dépourvu de cette activité. Nagaya (1954) a aussi recherché la phosphorylase dans cet organe.

Oreille

Vinnikov (1960) a recherché cette enzyme au niveau de l'organe de Corti. Selon cet auteur les cellules sensorielles de l'organe de Corti contiennent cette enzyme. L'activité de la phosphorylase change avec l'intensité des sons.

RATE

Chez l'homme et chez le lapin la réaction est limitée aux trabécules et à la capsule. Chez l'homme les artérioles montrent une réaction positive. Les pulpes rouge et blanche sont toujours négatives chez le rat, chez le cobaye, chez le lapin et chez l'homme.

FRACTION CELLULAIRE

L'activité de la fraction nucléaire du foie a fait l'objet de notre étude. Aucune activité phosphorylasique n'a été observée dans les frottis nucléaires, frais ou fixés préalablement à l'alcool absolu. Ceci nous permet de croire que la réaction phosphorylasique que nous avons obtenue dans les noyaux hépatiques, après la fixation des coupes fraîches à l'alcool absolu, n'est qu'un artéfact.

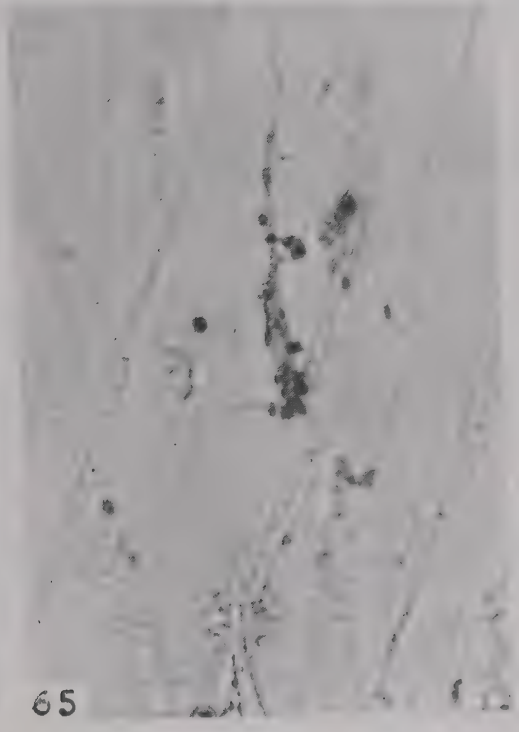
Lorsque les homogénats de foie de rat sont centrifugés à 8000×g., l'activité phosphorylasique reste entièrement dans le surnageant qui donne une coloration brune à l'iode. Aucune activité n'est présente dans les fractions particulaires. Lorsque les homogénats sont centrifugés à 24,000×g. la fraction microsomique, après l'incubation dans le substrat de la phosphorylase, donne une coloration brune à l'iode, identique à celle qu'on obtient sur les coupes de foie. Puisque cette fraction contient une grande partie de glycogène, il nous paraît fort probable que cette réaction est due à l'adsorption de la phosphorylase sur la molécule du glycogène. En effet, Madsen et Cori (1958) et Robbins, Traut et Lipmann (1959) ont observé la réaction phosphorylasique dans le précipité après l'ultracentrifugation.

Culture de tissus

Figure 64 - L'activité dans les cellules en culture provenant d'embryon de poulet de 9 jours.
L'activité dans deux cellules-filles.

Figure 65 - L'activité dans le fibroblaste de l'embryon humain.

Figure 66 - L'activité dans les cellules en division.



65

66

B. CULTURE DES TISSUS

A côté des recherches enzymatiques pratiquées sur des pièces coupées au cryostat, les cultures de tissus représentent un excellent objet d'études de telles recherches. Nous avons appliqué à des cultures de fibroblastes la technique permettant la caractérisation d'une activité phosphorylasique.

Les cultures de fibroblastes ont été obtenues sur le milieu classique en goutte pendante (plasma de poule et jus embryonnaire). Le fragment d'origine provenant du coeur d'embryons de poulet de 8 à 9 jours d'incubation.

La solution de Ringer employée a été parfois remplacée soit partiellement soit totalement par la solution de Hanks. Mais les résultats ont été moins intéressants lorsque cette dernière solution était utilisée exclusivement. La goutte contenant le fragment en culture était fortement amincie.

Les réactions ont été réalisées sur des cultures en bonne croissance de 24 à 48 heures ou après le premier repiquage.

La technique est comme pour la phosphorylase totale. Seul le temps d'incubation a varié entre 45 minutes et 2 heures à 37°C. Dans un cas, le polysaccharide synthétisé a été décelé par la réaction à l'acide périodique-Schiff (PAS).

RESULTATS

Une réaction positive n'a été obtenue que dans les cultures initiales de 24 à 48 heures ou après le premier repiquage. Au delà de 48 heures, aucune activité phosphorylasique n'est plus observée.

La réaction s'observe dans les cellules en mitose (fig. 66) sous forme de granulation rouge-brun ou rouge-violacé selon le degré de polymérisation du polysaccharide obtenu.

L'activité phosphorylasique peut exister aux différentes phases de la mitose, mais elle ne s'observe pas dans toutes les cellules en mitose. Elle est toujours faible dans les fibroblastes. Les cultures poussées en présence de la nicotinamide n'ont montré aucune activité.

La présence éventuelle de quelques gouttelettes lipidiques dans les cellules en mitose n'empêche pas la réaction de se produire.

Parfois une légère activité a été observée dans le milieu intercellulaire, mais cette réaction est probablement due à la phosphorylase du jus embryonnaire utilisé pour la culture. Souvent une réaction s'observe dans des cellules de l'explant.

DISCUSSIONS

Nos recherches montrent qu'une activité phosphorylasique peut être mise en évidence dans les cellules en culture. Mais cette activité ne s'observe que lors de la mitose et, dans les cultures que nous avons utilisées, seulement dans certaines cellules.

Le comportement différent des cellules d'une même culture peut être interprété de la façon suivante : il s'agissait de cultures dites de fibroblastes obtenues, comme nous l'avons indiqué, par l'explantation d'un fragment de coeur embryonnaire. Or, en réalité la population d'une telle culture au début de son évolution, est hétérogène. Verne (1937) a déjà signalé qu'un fragment de coeur donne en culture dans ces conditions, d'une part des myoblastes et d'autre part des fibroblastes vrais, pouvant provenir de l'endocarde ou du péricarde. Selon Verne (1937, p.55) "A mesure que la culture se poursuit et que l'on fait des repiquages, les myoblastes se font plus rares soit qu'ils disparaissent, cédant la place aux fibroblastes". Il est donc permis de penser que l'activité phosphorylasique est caractéristique d'une catégorie de cellules, les myoblastes dans nos cultures et ceci au moment de leur mitose. A l'appui de cette conclusion viennent les faits observés par nous que le nombre des cellules en mitose diminue jusqu'à disparition au delà du deuxième repiquage. D'autre part les cellules en question ont une forme plus large, plus trapue que les fibroblastes, ce qui révèle leur nature myoblastique.

C. L'ACTIVITE PHOSPHORYLASIQUE CHEZ LES RATS NOUVEAUX-NES

Les tissus de rats nouveau-nés de 1 à 4 jours ont fait également l'objet de nos recherches de la phosphorylase.

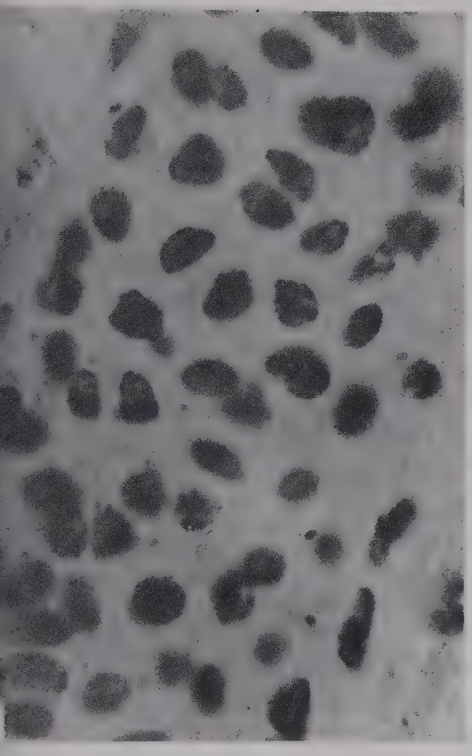
FOIE

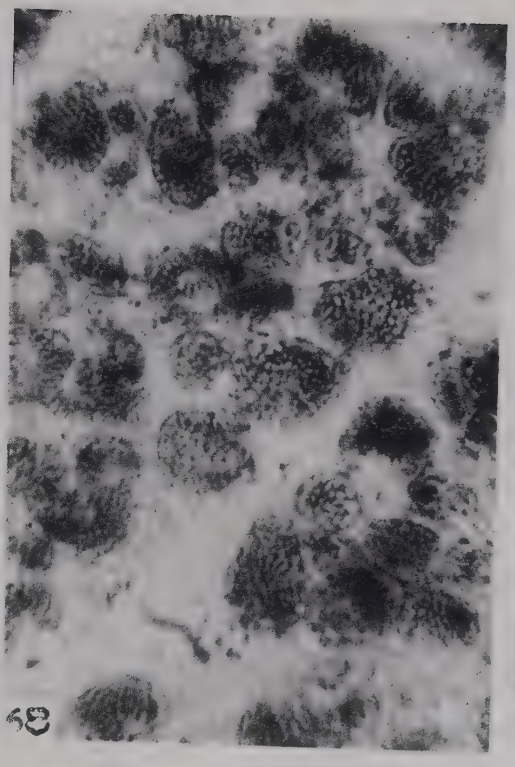
L'activité phosphorylasique du foie chez les nouveau-nés est révélée d'une façon inconstante et irrégulière depuis le premier jour. Le premier

Figure 67 - Cartilage de rat nouveau-né. Toutes les chondrocytes sont positives à la réaction.

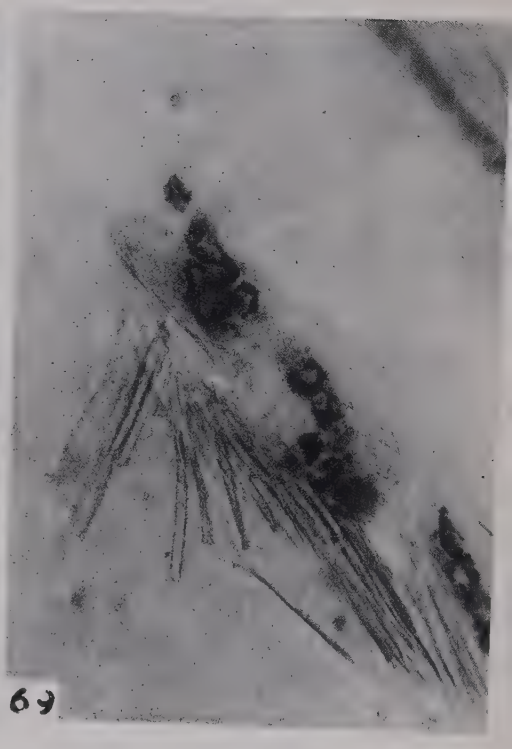
Figure 68 - Muscle droit de cuisse de rat nouveau-né. Coupe transversale.

Figure 69 - Les cellules papillaires dans la tige de la plume de poulet.





68



69

et le deuxième jour la phosphorylase est présente dans quelques cellules isolées. Pendant le troisième et le quatrième jour la réaction est constante mais diffuse. Cette diffusion de l'enzyme rend la localisation topographique impossible.

MUSCLE

Shapiro et Wertheimer (1943), par l'analyse biochimique, n'ont pu trouver une activité dans le muscle de rats nouveau-nés jusqu'au dixième jour.

Contrairement aux observations de Shapiro et Wertheimer, nous avons trouvé une activité phosphorylasique dans le muscle droit de la cuisse (rectus femoris) de rats nouveau-nés dès le premier jour de leur naissance. Cette activité est démontrée d'une façon constante pendant les 4 premiers jours après la naissance. La réaction est en principe plus faible que chez l'adulte (fig. 68).

CARTILAGE

Un grand nombre des chondrocytes montrent une activité intense de la phosphorylase et ceci dès le premier jour. Le nombre de ces cellules positives diminue progressivement jusqu'au quatrième jour. Les chondrocytes en division sont toujours très riches en phosphorylase. Dans la partie minéralisée de cartilage, les chondrocytes sont totalement négatives (fig. 67).

REIN

L'activité de la phosphorylase n'est pas remarquée chez les rats adultes. Mais chez les rats nouveau-nés une activité assez intense est remarquée dans les tubes collecteurs et dans une autre série des tubes dans le cortex du rein, dès le premier jour. L'activité est déjà faible au deuxième jour. Le troisième jour souvent l'activité disparaît complètement.

D. L'ACTIVITE PHOSPHORYLASIQUE CHEZ LES EMBRYONS

Les divers organes de l'embryon humain ont fait l'objet des recherches phosphorylasiques de Kobayakawa (1957). Selon cet auteur

les tissus de l'embryon humain peuvent être classés en trois groupes selon leur réactivité :

- Dans le premier groupe d'organes, l'activité phosphorylasique est très intense au stade primitif.
- Dans le deuxième groupe, l'activité est intense seulement vers la fin de la grossesse et après la naissance.
- Le troisième groupe est intermédiaire entre les deux premiers.

Les cellules glandulaires du pancréas, de la glande salivaire, l'épithélium alvéolaire du poumon, l'épithélium de la capsule de Bowman appartiennent au premier groupe. En principe l'enzyme dans ces organes est active dès le troisième mois. L'activité est très intense du cinquième au septième mois et puis diminue progressivement.

Dans ce groupe l'enzyme paraît avoir une relation avec la différenciation et la croissance.

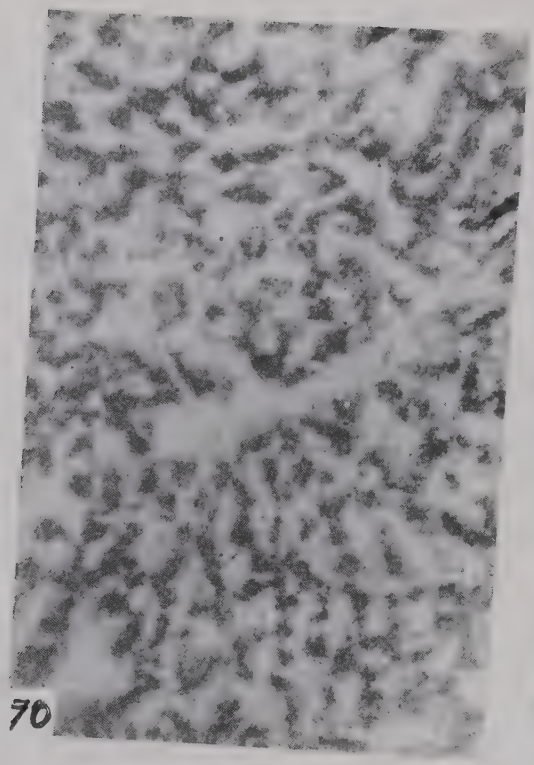
Le myocarde, les muscles squelettiques, le muscle lisse, le tissu nerveux, les cellules hépatiques, les cellules cartilagineuses, les cellules de la glande sudoripare et les cellules de tubes collecteurs appartiennent au deuxième groupe. Dans ce groupe l'enzyme peut avoir une relation avec les fonctions physiologiques.

Le troisième groupe comprend l'épithélium, la langue, l'œsophage, l'estomac et l'uretère.

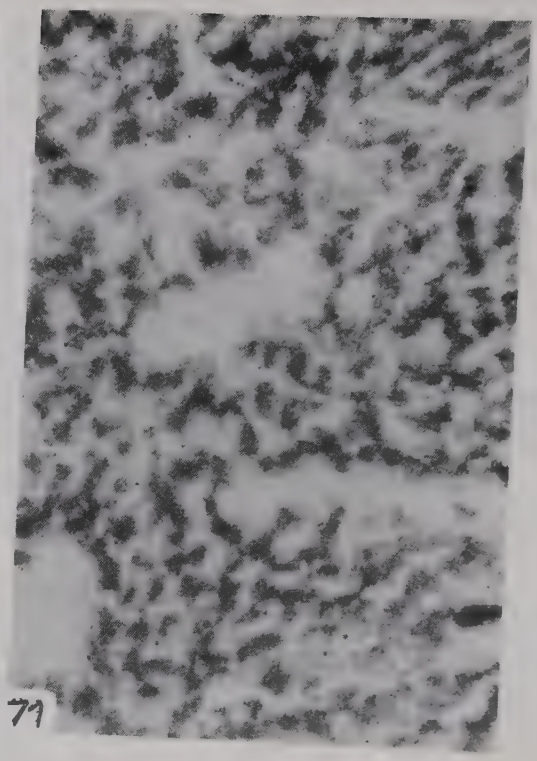
Mais Kobayakawa (1957) n'a pu étudier le rapport entre la forme active et la phosphorylase totale. Il n'a pas pu signaler l'apparition des systèmes enzymatiques qui maintiennent l'équilibre entre la forme active et la forme inactive de la phosphorylase totale.

Nous avons étudié l'activité phosphorylasique dans le foie d'embryon de poulet. Les embryons de huit à dix-huit jours ont fait l'objet de ces recherches. Les embryons de huit à dix jours ont été coupés entiers au cryostat. Pour les autres embryons le foie a été prélevé de l'embryon et coupé au cryostat.

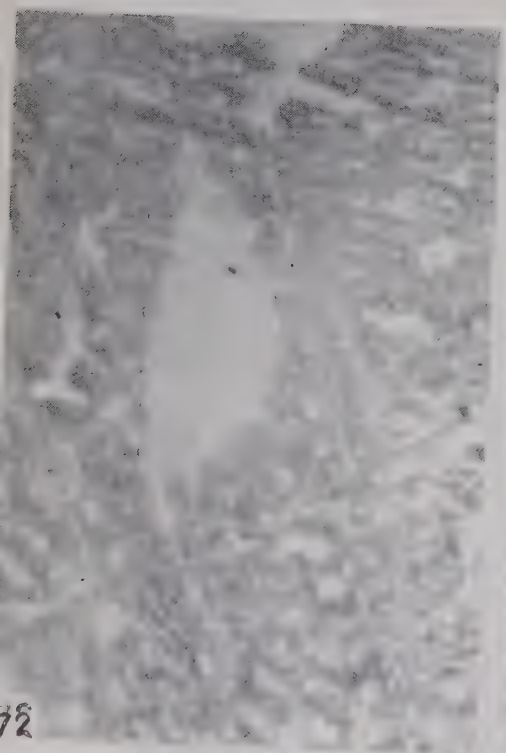
Dans les embryons jusqu'au onzième jour l'activité de la phosphorylase active et de la phosphorylase totale est également intense. Ceci prouve que jusqu'à ce stade la phosphorylase est présente uniquement sous forme active (fig. 70 et 71). Dès le douzième ou le treizième jour apparaît une différence de l'intensité de l'activité entre la phosphorylase active et la phosphorylase totale. Dès le quatorzième jour la forme inactive de la phosphorylase devient la forme prédominante. Ce phénomène indique que les systèmes enzymatiques responsables de l'équilibre dynamique entre les deux formes phosphorylasiques (active et inactive) apparaissent dès le 12e ou le 13e jour. L'embryon du poulet, comme chez l'adulte, contient la phosphorylase hépatique sous une forme prédominante inactive jusqu'au 18e jour. A ce stade la phosphorylase active préexistante est souvent absente.



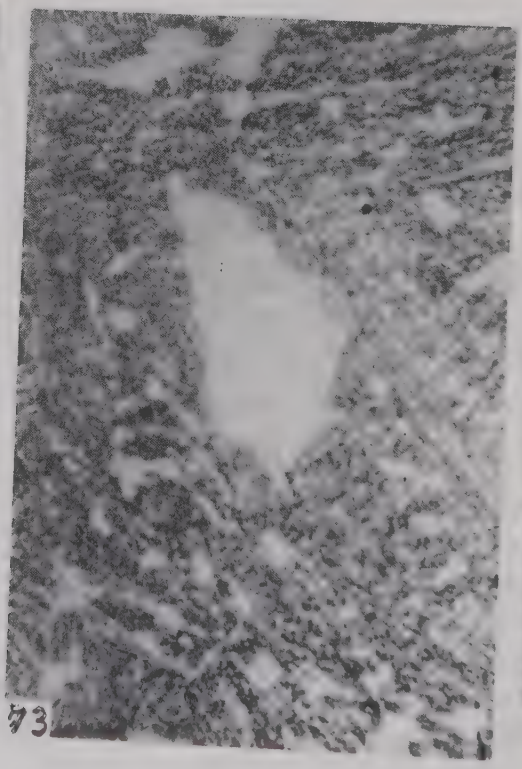
70



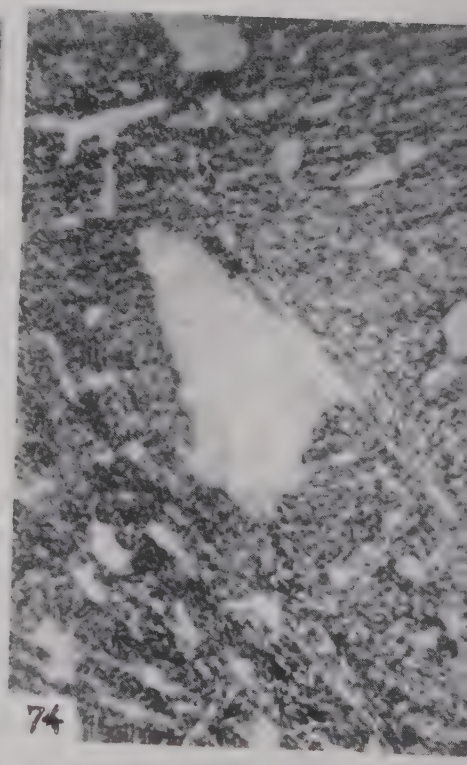
71



72



73



74

Figure 70 - L'activité de la phosphorylase active préexistante dans le foie d'embryon de poulet, 8 jours.

Figure 71 - Phosphorylase totale dans la coupe successive du même foie. L'intensité de la réaction est identique à celle de la phosphorylase active, ce qui indique que la phosphophosphorylase à ce stade existe totalement sous forme active.

Figure 72 - Foie d'embryon de poulet 14 jours. L'activité phosphorylasique après l'incubation dans le milieu contenant le glucose-1-phosphate, l'acide adénylique (5'-AMP) et quelques gouttes de l'adrénaline.

Figure 73 - Phosphorylase active préexistante dans la coupe successive du même foie d'embryon de poulet (14 jours). L'intensité de la réaction est identique à celle de la figure précédente.

Figure 74 - Phosphorylase totale de la coupe successive du même foie. L'activité est beaucoup plus intense que dans les coupes précédentes indiquant qu'à ce stade la forme inactive devient la forme prédominante.

La forme inactive de la phosphorylase hépatique de l'embryon du poulet n'est pas activée par le 5-AMP (fig. 73).

La phosphorylase embryonnaire est légèrement activée par l'adrénaline, in vitro, en présence d'ATP et Mg^{++}. L'adrénaline n'a aucune action sur la phosphorylase inactive en l'absence d'ATP et d'ions Mg^{++} (fig. 72).

Grillo (1960) a étudié l'activité phosphorylasique dans le foie d'embryon du poulet.

Grillo (1961) a recherché la phosphorylase dans le foie, dans le muscle squelettique et dans le myocarde d'embryon de poulet. Il a trouvé une activité phosphorylasique dans le foie dès le 7e jour et la phosphorylase musculaire dès le 13e ou le 14e jour. Selon cet auteur, la forme inactive de la phosphorylase hépatique est prédominante même dès le 7e jour.

Chapitre IX

EEFET DES ACTIVATEURS ET DES INHIBITEURS DE LA PHOSPHORYLASE

INTRCDUCTICN

Dans les coupes des tissus non-fixés, cette enzyme reste dans un état hydrosoluble. On a observé qu'une préincubation des coupes dans un agent quelconque en solution peut empêcher cette activité. Même une incubation dans le milieu tamponné (sans le glucose-1-phosphate) suffisait pour faire disparaitre cette activité. Un phénomène identique a été observé par Burstone (1958) pour les enzymes hydrolytiques dans les coupes non fixées. Pour cette raison, lorsque l'effet d'un agent activateur a été étudié, on l'ajoutait directement dans le milieu d'incubation.

A. ACTIVATICN PAR ADENCSINE-5-MCNCPHCSPHATE (AMP)

La forme active de la phosphorylase est activée davantage par l'AMP. Cette activation a été étudiée dans le muscle par Cori et Cori (1945) et dans le foie par Sutherland et Wosilait (1956) et par Hadjiolov et Dancheva (1959). Nous avons voulu étudier l'action de ce mononucléotide sur la phosphorylase synthétisée par la réaction de Guha et Wegmann (1959).

Matériel et méthode

Le foie, le muscle, et l'utérus du rat et le foie de cobaye ont été utilisés pour cette étude.

L'adénosine monophosphate à une concentration de 0,001 M (environ), soit 10 mg pour 25 cc a été ajouté directement dans le substrat normalement employé pour la mise en évidence de la phosphorylase totale.

Une autre solution a été préparée selon la manière suivante. L' adénosine triphosphate (ATP) du substrat a été remplacé par l'AMP.

La solution comprend ainsi :

Glucose-1-phosphate	50 mg
Fluorure de sodium	21 mg
Acide adénosine monophosphorique.	20 mg
Sulfate de magnésium	8 mg

Tamponné par le tampon acétate (pH 6,0)

Le milieu d'incubation pour la phosphorylase totale était employé comme témoin.

Résultats

Une activation a été remarquée lorsque les coupes du foie, du muscle et de l'utérus ont été incubées dans le milieu d'incubation pour la phosphorylase totale contenant l'AMP. Par contre, l'incubation dans la solution dans laquelle l'ATP était remplacé par l'AMP n'a pas montré d'activation. Dans le foie de rats l'activité restait négative lorsque l'ATP était remplacé par l'AMP. Dans le foie d'un cobaye où il y avait une certaine quantité de la phosphorylase active, la phosphorylase était activée davantage par l'AMP.

B. EFFET DU CYCLO 3',5'-AMP

Sutherland et ses collaborateurs(1957) au cours de leurs études sur l'effet de l'adrénaline et du glucagon sur la phosphorylase, ont remarqué que l'activation de l'enzyme par le glucagon et par l'adrénaline comprend deux étapes. La première consiste en une formation d'un ribonucléotide inconnu et la deuxième étape consiste en l'activation spécifique de la phosphorylase par ce ribonucléotide. Plus tard, ce ribonucléotide a été identifié par Sutherland et ses collaborateurs (1958) avec un cyclo ribonucléotide synthétisé artificiellement à partir d'ATP par Cook, Lipkin et Markham (1957). Ce nucléotide est composé de deux molécules d'AMP liées par leurs carbones respectifs 3 et 5. Pour Haynes et ses collaborateurs (1960) la phosphorylase est liée par les carbones 3 et 5 de la même molécule d'AMP.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de ce ribonucléotide sur la phosphorylase active et sur la phosphorylase totale. Puisque ce nucléotide active la phosphorylase in vivo, il est également intéressant de voir s'il est capable de transformer la phosphorylase inactive du foie en forme active.

Ce nucléotide est assez instable. Pour cette raison la solution avec ce cyclo-AMP a été préparée juste avant l'emploi. 2 mg de ce nucléotide ont été ajoutés dans le milieu (5 cc) pour la phosphorylase active préexistante et dans une autre solution pour la phosphorylase totale. Les coupes du foie d'un lapin dépourvu de la phosphorylase active ont été employées pour cette étude.

La phosphorylase totale (en présence d'ATP et Mg^{++}) est activée davantage par ce cyclo-nucléotide. La phosphorylase active, lorsqu'elle est présente dans les coupes, est aussi activée davantage. Cette activation est identique à celle de 5'-AMP. Mais l'activation de la phosphorylase inactive, en absence d'ATP et de Mg^{++} est moins constante lorsque la coupe de foie est totalement dépourvue de la phosphorylase active. Cette irrégularité d'action est probablement due à l'instabilité du cyclo 3',5'-AMP. Rall, Sutherland et Berthet (1958) ont constaté que ce cyclo AMP est facilement dégradé en 5'AMP par une enzyme présente dans les organes.

D'après ces résultats on peut conclure que le cyclo 3',5'-AMP est capable d'activer non seulement la forme active de la phosphorylase hépatique mais aussi, contrairement à l'AMP, la phosphorylase inactive du foie.

C. ACTIVATION IN VITRO PAR LA PROTAMINE

Nous avons déjà signalé que la forme prédominante de la phosphorylase dans les organes, à l'état de repos, est la forme inactive ou la forme b. La forme inactive de la phosphorylase peut être activée par l'AMP dans tous les organes sauf dans le foie. Ce phénomène est la base de la technique de Takeuchi et Kuriaki (1955). Mais la phosphorylase, sous forme active, peut exister dans quelques tissus, même dans les conditions normales. Les données sur la transformation et l'activation des deux formes de la phosphorylase sont représentées dans le schéma suivant :

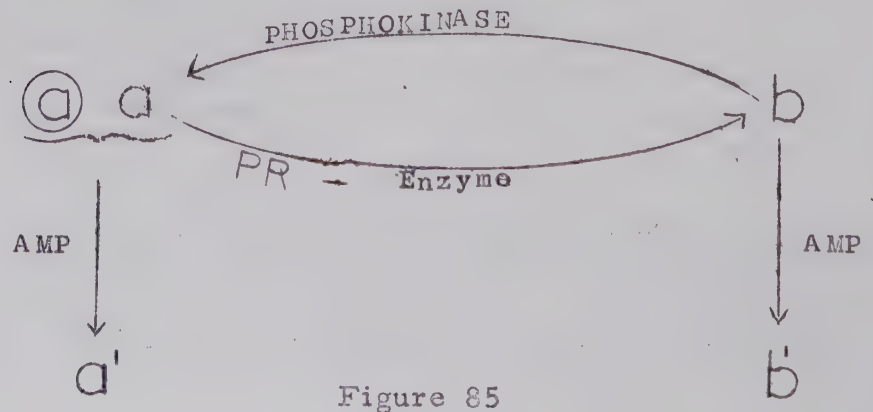


Figure 85

Dans ce schéma, la forme inactive de la phosphorylase est représentée par b. La forme activée de la forme inactive est désignée arbitrairement par b'. La forme active est désignée par a. et (a). Les formes (a) et a sont identiques de point de vue chimique et de point de vue de réaction enzymatique. La forme (a) signifie la forme active préexistante de la phosphorylase tandis que la forme a signifie la forme active synthétisée par la phosphorylase-kinase, au cours de l'incubation. L'état actif de la phosphorylase a sous l'influence de l'acide adénylique est arbitrairement désigné par a'.

Selon Krebs (1954) la phosphorylase a (forme active) cristallisée du muscle est inhibée par une faible concentration de la salmine (protamine). La présence d'AMP dans le milieu d'incubation n'empêche pas cette inhibition, tandis que l'affinité de la phosphorylase b (forme inactive) pour l'acide adénylique est augmentée en présence de la salmine.

Nous avons recherché l'action de cette protéine basique sur la phosphorylase active, en présence et en absence de l'AMP, sur la phosphorylase b activée (b') et sur le système phosphorylase kinasique.

Les 4 milieux différents, indiqués dans le tableau suivant, ont été employés afin de déterminer l'activité des différentes formes de la phosphorylase et le comportement du système phosphorylase-kinasique sous l'influence in vitro de la protamine.

Tableau X

SOLUTION	MILIEU INCUBATEUR	ENZYME ACTIVE	
Solution I	G-1-P + FNa Tamponné à pH = 6,0 Goldberg et coll. (1952) modifiée	Phosphorylase active (forme a) préexistante	(a)
Solution II	G-1-P + AMP Tamponné à pH = 6,0 Takeuchi et Kuriaki (1955)	Phosphorylase b activée	b'
Solution III	G-1-P + ATP + Mg^{++} + FNa Tamponné à pH = 6,0 Guha et Wegmann (1959)	Phosphorylase a préexistante et synthétisée (b ⟶ a)	(a) + a
Solution IV	G-1-P + ATP + Mg^{++} + FNa + + AMP	Phosphorylase a activée Phosphorylase b activée	(a) + a + a' + b'

Pour cette étude, la solution du sulfate de protamine (1%) a été diluée par l'eau bidistillée à des concentrations diverses. Le milieu d'incubation a été préparé dans 14 cc d'eau bidistillée au lieu de 15 cc employé normalement. Le volume de la solution tamponnée de substrat était de 24 cc au lieu de 25 cc. Les concentrations de protamine variaient entre 4 µg (0,0004 cc de la solution de protamine) et 400 µg (0,04 cc) pour chaque cc du substrat. La solution diluée de protamine, 0,1 cc a été ajoutée à 2,4 cc de la solution du substrat. La durée d'incubation est de 10 à 30 minutes. La mise en évidence est identique à celle qui est précédemment décrite.

RESULTATS

Les études sur le muscle, sur le foie et sur le myocarde de rat, de cobaye et de lapin ont montré que la protamine jusqu'à une concentration de 40 µg p. cc n'a aucun effet sur l'activité de la phosphorylase totale. Mais la protamine à des concentrations variant entre 40 et 400 µg par cc active considérablement la phosphorylase totale. La forme activée (b') de la phosphorylase b du muscle, étudiée en présence d'AMP (solution II des milieux d'incubation) est également activée plus intensément par la protamine. Mais le muscle, le myocarde de ces animaux et le foie de rat étudiés n'ont montré aucune activité lorsque ces organes sont incubés dans la solution I. Ceci signale l'absence de la phosphorylase a préexistante dans ces organes. La présence même de la protamine dans ce milieu d'incubation ne démontre pas une activité dans les organes indiqués.

Le foie d'un cobaye a montré l'existence de la phosphorylase active préexistante. Lorsque les coupes de cet organe ont été incubées dans la solution I. L'activité de cette forme de la phosphorylase est nettement augmentée par la protamine. Les effets des concentrations de la protamine échelonnée entre 40 µg et 400 µg sont signalés dans le graphique 86.

La forme a' de la phosphorylase est également activée par la protamine lorsque celle-ci est ajoutée dans la solution IV à des concentrations variant entre 40 et 400 µ g p. cc. Les données sur l'action de la protamine sur les différentes formes, sauf la phosphorylase active préexistante, sont résumées dans le graphique 87

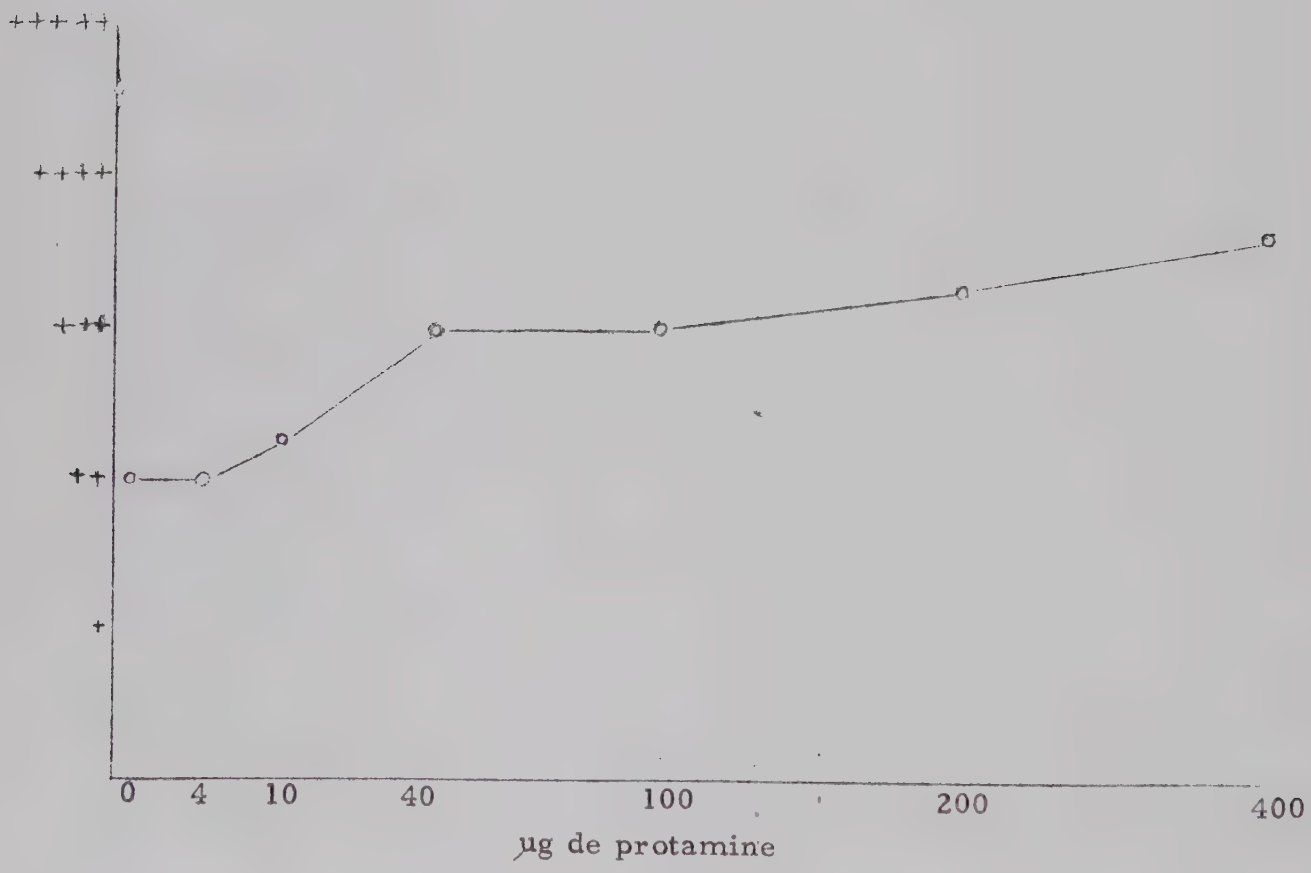


Fig. 86 - Action de la protamine sur la phosphorylase active préexistante.

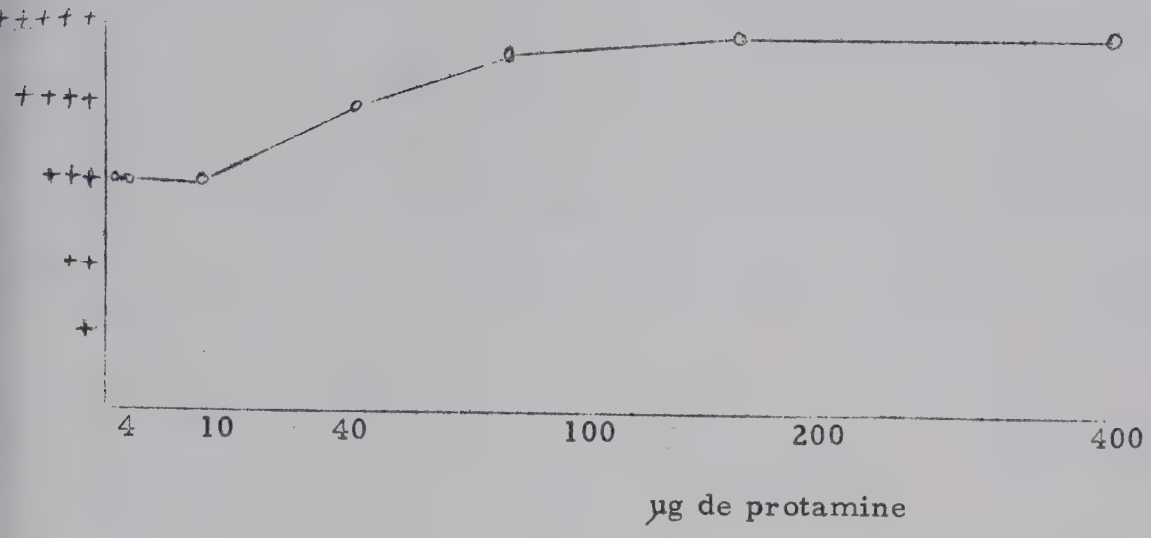


Fig. 87.- Activité des différentes formes de la phosphorylase sous l'influence de la protamine dans le muscle, dans le foie et dans le myocarde

INTERPRETATION

Selon Krebs (1954) la phosphorylase cristallisée du muscle est inhibée par une faible concentration de la salmine et cette inhibition diminue progressivement par une augmentation progressive de la salmine. Une courbe diphasique est obtenue par l'action de la salmine sur la phosphorylase a. Cette courbe est obtenue même en présence d'AMP dans le milieu d'incubation.

D'après les résultats obtenus par nous il est évident que la protamine, même à faible concentration, n'entraîne aucune inhibition sur l'activité phosphorylasique dans les conditions histochimiques. Par contre, la protamine aux concentrations supérieures à 40 µg par cc a une action activatrice sur la phosphorylase. Cette activation est évidente même en absence d'AMP.

Krebs (1954) a aussi constaté que l'affinité de la phosphorylase b pour l'AMP est augmentée en présence de la salmine. Ce phénomène est confirmé par nos études sur la phosphorylase b en présence d'AMP. L'action activatrice de la protamine sur la phosphorylase b activée (b') est très évidente.

La phosphorylase a, dans les conditions histochimiques est activée par l'AMP. Cet état actif, désigné comme phosphorylase a' dans le schéma, est aussi suractivée par des concentrations de la protamine variant entre 40 µg et 400 µg. La protamine à faible concentration n'a aucun effet sur cette forme. Aucune inhibition n'a été observée même avec 4 µg par cc. de la protamine.

La protamine n'est pas capable d'activer la phosphorylase b en l'absence soit d'AMP, soit d'ATP et de Mg^{++}. Ce phénomène indique que la protamine n'a aucun effet sur le système phosphorylase-kinasique. En somme, la protamine réagit sur les différentes formes de la phosphorylase et non sur le système transformateur de la phosphorylase.

On peut se demander quel est le mécanisme de l'activation de la phosphorylase par la protamine ? Madsen et Cori (1954) ont observé que la phosphorylase dans la solution, est précipitée par la protamine. Ce précipité est un complexe de la protamine et de la phosphorylase qui est catalytiquement actif. La précipitation est maxima à 0°C. Même à la température optima de l'enzyme, une certaine quantité de la phosphorylase reste précipitée. Cette constatation explique facilement l'activation par la protamine. Cette protéine basique, sans avoir diminué l'activité enzymatique, diminue la solubilité de la phosphorylase. La diminution de la solubilité d'une enzyme est une condition qui favorise la mise en évidence histochimique de l'activité enzymatique.

Krebs (1954) et Madsen et Cori (1954) ont recherché l'effet de la protéine basique sur la phosphorylase du muscle seulement. Mais nous avons déjà remarqué que la phosphorylase des différents organes réagit de façon différente sous l'influence des activateurs et des inhibiteurs. Nous avons déjà signalé que la phosphorylase inactive du foie n'est pas activée par l'AMP et nous verrons plus tard que la phosphorylase du myocarde et la phosphorylase d'autres organes ne sont pas inhibées par une même concentration de monoiodoacétate. Nous nous sommes alors demandé si l'activation induite par la protamine est spécifique d'un organe particulier. Nos études démontrent que l'activation par la protamine n'est pas spécifique pour un organe déterminé (Cuna et Wegmann 1960).

D. EFFET IN VITRO DE L'HEPARINE

L'héparine, le principe anticoagulant physiologique, exerce une influence inhibitrice sur les enzymes tels que la fumarase, la trypsine, l'hyalurodidase et les phosphatases acides et alcalines. De plus, l'héparine a une action réversible à celle de la protamine. Nous avons déjà signalé que la protamine à une concentration de 400 µg p. cc exerce une action activatrice sur la phosphorylase. Il nous a donc paru intéressant de voir si l'héparine a une action quelconque sur la phosphorylase.

La solution diluée de l'héparine a été ajoutée directement dans le milieu d'incubation. 0,02 cc de l'héparine soit 400 µg par cc a été ajoutée dans le substrat pour la phosphorylase totale. Le mode d'incubation et la mise en évidence sont identiques à ceux qui sont décrits précédemment.

Aucune action n'a été observée sur les coupes du muscle et du foie de rat. L'intensité de la réaction reste égale à celle des coupes normales. La concentration de l'héparine est alors dédoublée (800 µg/cc). Encore aucun changement n'a été remarqué. Nous avons alors conclu que l'héparine n'a pas une action sur la phosphorylase totale du foie et du muscle.

E. EFFET DE L'INSULINE

L'insuline provoque la synthèse du glycogène à partir du glucose dans les organes tels que le foie et le muscle. Sutherland (1949) a remarqué que l'insuline, à une concentration faible, augmente l'activité de la phosphoglucomutase. Mais cet auteur n'a pu remarquer une augmentation de l'activité phosphorylasique.

Takeuchi et Kuriaki (1955) ont employé l'insuline dans leur milieu d'incubation pour l'étude histochimique. Selon ces auteurs, la présence d'insuline augmente la glycogénèse par la phosphorylase.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de l'insuline sur l'activité de la phosphorylase dans les conditions histochimiques.

Une suspension d'insuline-zinc cristallisée a été utilisée pour nos études. 0,1 cc de cette suspension (4 U I) a été ajouté à 25 cc du milieu d'incubation. Le mode d'incubation et de la mise en évidence demeurait identique aux essais précédents. Aucune activation par rapport à l'incubation normale n'a été remarquée. Nous avons alors augmenté la concentration de l'insuline. Une concentration de 40 U I de l'insuline a été ajoutée au milieu d'incubation. L'activité de la phosphorylase reste inchangée même à cette concentration de l'insuline.

F. EFFET DES AGENTS REDUCTEURS

La phosphorylase cristallisée du muscle est activée en présence des agents réducteurs tels que le cyanure de potassium, le glutathion réduit (GSH), et la cystéine (Cori et Cori 1940), mais en même temps, il a été remarqué que ces agents réducteurs augmentent la solubilité de cette enzyme (Green et Cori 1943).

La solubilité augmentée d'une enzyme est une condition défavorable pour sa mise en évidence histochimique. Malgré ce fait, nous avons essayé de démontrer l'action de ces agents réducteurs sur l'activité de ce système enzymatique.

Cyanure de potassium

Le cyanure de potassium (0,01 M) a été ajouté directement dans les milieux d'incubation de la phosphorylase totale et de la phosphorylase active préexistante. Les coupes du muscle et du foie ont été incubées pendant 30 minutes.

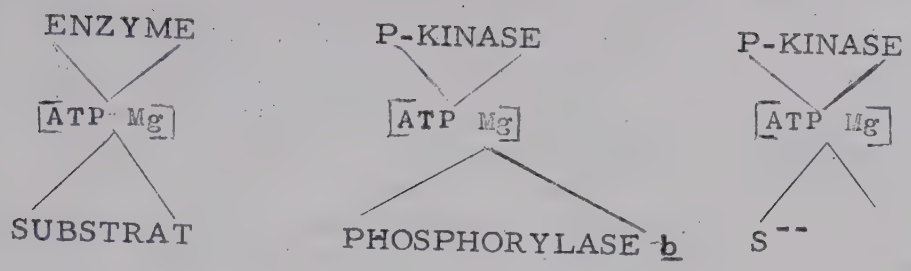
La coloration à l'iode est fortement réduite en comparaison des coupes incubées dans les milieux normaux.

Réactifs sulfhydrylés

Les agents réducteurs contenant le groupe tels que la cystéine, le glutathion réduit (GSH), le 2-mercaptoéthanol (Eastman), l'acide thioglycollique (80%) ont été ajoutés à la solution du substrat à des concentrations variables entre 0,002 M et 0,02 M. L'intensité de la coloration à l'iode est partiellement diminuée en présence de ces agents réducteurs à la concentration de 0,002 M. La disparition de la coloration est progressive avec l'augmentation de concentration des agents réducteurs. La perte de coloration est totale à la concentration de 0,02 M de ces réactifs.

Plusieurs raisons ont été envisagées pour expliquer cette diminution de la réaction à l'iode. Il faut considérer que l'activation par les agents réducteurs a été obtenue sur la phosphorylase purifiée.

A) Il paraissait probable que la perte de coloration pouvait être due à l'inhibition de la phosphorylase kinase. La kinase a besoin d'ions Mg^{++} pour son activité. Pour cette raison elle peut être considérée, comme un métallo-protéine. Les agents sulfhydrilés inhibent les enzymes qui ont besoin de métaux bivalents pour ces activités, selon le mécanisme signalé dans la figure suivante (Smith (1951).



L'enzyme dans ce schéma est la phosphorylase-b-kinase, et le substrat représente la forme inactive de la phosphorylase (Phosphorylase b du muscle ou la déphospho-LP du foie).

Mais Krebs et ses collaborateurs (1955) ont déjà signalé que la phosphorylase-b-kinase du muscle n'est pas inhibée par la cystéine.

On ne sait pas si la phosphorylase-kinase du foie est aussi insensible à l'action de la cystéine. Pour éviter cette situation, le foie d'un cobaye qui contient une quantité considérable de la phosphorylase active a été utilisé pour cette étude. Les coupes de ce foie ont été incubées dans la solution du substrat destiné à visualiser la phosphorylase active préexistante. La cystéine, à des concentrations de 0,002 M à 0,02 M a été ajoutée dans ce milieu. Dans cette condition, la coloration à l'iode est absente lorsque la concentration de la cystéine est élevée à 0,02 M.

On peut donc conclure que la perte de la coloration induite par l'iode n'est pas due à l'inhibition de la phosphorylase kinase.

B) Les réactifs contenant le groupe SH sont capables de titrer l'iode. Pour cette raison, la présence des agents sulfhydrilés peut empêcher la coloration à l'iode. Le court rinçage de 30 secondes dans l'eau distillée, avant le traitement au Lugol, peut ne pas être suffisant pour débarrasser les coupes de l'agent sulfhydrilé.

Pour éviter la réaction probable du groupe SH avec l'iode, le mode d'opération a été modifié. Les coupes de tissus étaient incubées dans les milieux avec la cystéine en concentrations variées et dans le milieu sans cystéine. Après l'incubation, les coupes sont introduites dans l'alcool 96% froid qui conserve le polysaccharide néoformé, par contre, la cystéine est dissoute dans l'alcool.

Après 4 heures, les coupes étaient traitées par l'alcool 95% à la température ambiante pendant une heure, et dans l'alcool absolu pendant une heure. Des coupes ainsi traitées conservent le polysaccharide mais sont dépourvues de la cystéine.

Les coupes étaient traitées par l'alcool iodé (une pincée d'iode dans l'alcool absolu) pendant 10 minutes. Les sièges de l'activité phosphorylasique étaient colorés en brun. La coloration est très faible dans les coupes incubées dans les milieux contenant la cystéine à des concentrations de 0,002 M à 0,001 M. Là aussi, la coloration disparaît à la concentration de 0,02 M de cystéine.

D'après ces résultats, on peut conclure que la suppression de la coloration n'est pas due à la présence du groupe thiosulfate dans les coupes.

Dans ces conditions, une seule explication vient à l'appui des données biochimiques : la phosphorylase elle-même est responsable de cette inhibition apparente. Cette enzyme, par suite d'une solubilité plus grande sous l'influence des agents réducteurs, est dissoute dans la solution du substrat, au lieu de rester localisée à ses sièges morphologiques; en conséquence, elle ne peut pas être visualisée par les techniques histochimiques.

G. EFFET DU PARACHLOROMERCURIBENZOATE (PCMB)

La protéine de la phosphorylase contient des groupes thiols actifs qui sont nécessaires pour son action. Ces groupes SH liés à la protéine peuvent être bloqués par les mercuriels organiques tels que le parachloromercuribenzoate (PCMB). Madsen et Cori (1956) ont observé que le PCMB est capable de bloquer les groupes SH de la phosphorylase et d'inhiber la réaction de la phosphorylase. Cette inhibition est réversible par la cystéine. Mais, en même temps, ces auteurs ont remarqué par l'étude spectrométrique et par l'étude enzymatique simultanées, que la combinaison de ce mercuriel avec les groupes SH est presque instantanée, mais que l'inhibition enzymatique ne se produit qu'après une incubation prolongée.

Dans nos études, l'acide parachloromercuribenzoïque en forme de poudre, est dissout dans une solution 0,1 N de NaOH. Après la dissolution complète, cette solution est ramenée à la neutralité par l'acide chlorhydrique normal. La solution d'incubation a été préparée par la substitution d'une partie de l'eau distillée à la solution de PCMB. Le PH est réglé à pH 6,0. Après l'incubation habituelle, nous avons remarqué que le PCMB jusqu'à la concentration de 0,0005 M n'a provoqué aucune inhibition de l'activité phosphorylasique, ni dans le foie, ni dans le muscle ou le myocarde.

La concentration de ce mercuriel n'a pas été élevée davantage, considérant le fait que les sels de mercure peuvent aussi provoquer une inhibition de la phosphorylase par l'empoisonnement causé par les métaux lourds.

L'absence d'inhibition dans cette condition peut être expliquée par le fait que le PCMB ne provoque pas une inhibition enzymatique instantanée de la phosphorylase. Il faut signaler que dans les conditions biochimiques, la phosphorylase cristallisée est incubée préalablement avec le PCMB pendant 60 minutes, afin de l'inhiber complètement. Mais la pré-incubation avec un inhibiteur ne peut pas être pratiquée pour les raisons déjà décrites. De plus, les métaux lourds diminuent, en principe, la solubilité des protéines. Mais, contrairement à ce principe, le PCMB augmente la solubilité de la phosphorylase en divisant la molécule en quatre sous-unités (Madsen et Gurd 1956). Ce phénomène rend inapplicable le mode de préincubation dans la condition histochimique.

H. EFFET DU GLUCOSE SUR L'ACTIVITE PHOSPHORYLASIQUE

Le glucose est un inhibiteur compétitif de la phosphorylase. Cette inhibition par le glucose est renversée par l'addition d'une petite quantité d'AMP (Cori, Cori et Green 1943). Shapiro et Wertheimer (1943) ont aussi observé la réversion de cette inhibition par l'AMP.

Dans les études histochimiques, Takeuchi et Kuriaki (1955) ont remarqué une inhibition par 20 mg du glucose dans 25 cc de la solution du substrat. Cette inhibition a été observée même en présence d'AMP.

Dans nos études, le glucose (25 mg p. 25 cc de la solution de substrat) a été ajouté directement à la solution du substrat de la phosphorylase totale. Après l'incubation normale, aucune inhibition de l'activité de la phosphorylase par rapport à l'activité du témoin n'a pas été observée. Nous avons alors doublé la concentration du glucose de la solution. Mais là encore, aucune inhibition n'a pu être observée, l'activité reste aussi intense qu'à l'état normal.

Quand on substitue le glucose-1-phosphate par le glucose, aucune activité n'est plus observée.

En employant le milieu d'incubation de Takeuchi et Kuriaki nous n'aurions pas pu obtenir une inhibition par le glucose.

Interprétation :

L'absence d'inhibition en présence du glucose peut être expliquée par deux phénomènes. Nous avons remarqué que l'inhibition par le glucose est renversée par l'AMP. Il est probable que l'ATP qui est présent dans notre milieu d'incubation est aussi capable de renverser l'inhibition par le glucose.

L'hexokinase, l'enzyme qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate est activée par l'ATP et par les ions Mg^{++}. Il est aussi probable que la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} dans notre milieu d'incubation pour la phosphorylase kinase active aussi l'hexokinase qui, à son tour, transforme le glucose en hexose phosphate. Le glucose-6-phosphate n'a aucune action inhibitrice sur la phosphorylase. Dans cette condition, le glucose transformé en hexosephosphate perd son action inhibitrice.

L'activité de la phosphorylase active préexistante du muscle est considérablement diminuée en présence du glucose.

I. EFFET DE LA PHLORIZINE

La Phlorizine a une action inhibitrice sur la phosphorylase. Cette inhibition est réversible en présence d'AMP (Cori, Cori et Green 1943).

La phlorizine est difficilement soluble dans l'eau. Dans nos expériences, nous avons employé des concentrations de la phlorizine allant jusqu'à 0,001 M. Au-dessus de cette concentration, elle est à peine soluble. La phlorizine a été ajoutée directement au milieu d'incubation de la phosphorylase totale. Après l'incubation dans ce milieu aucune inhibition de l'activité phosphorylasique n'a été observée.

Interprétation : Il paraît que l'ATP présent dans le milieu d'incubation est capable d'empêcher l'inhibition provoquée par la phlorizine.

J. INHIBITION PAR LE MONOIODOACETATE

Le monoiodoacétate inhibe l'activité des "SH-enzymes" en agissant sur leurs groupes SH selon la réaction suivante :

$$-SH + CH_2ICOOH = HI + SCH_2COOH$$

Ce genre d'inhibition est irréversible (Baldwin 1957). La phosphorylase a besoin des groupes SH pour son activité (Madsen et Cori 1956). Il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de l'iodoacétate sur l'activité phosphorylasique.

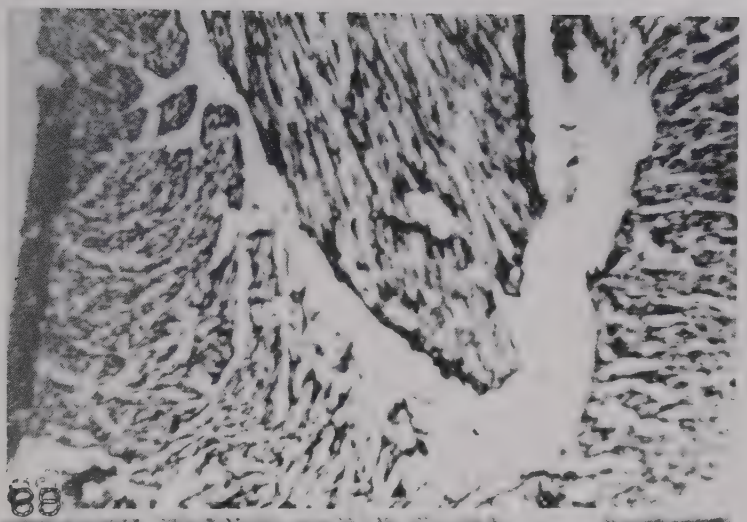
Les écailles blanches d'acide iodoacétique ont été dissoutes dans le milieu d'incubation à la concentration de 0,02 M à 0,002 M. Le milieu d'incubation devient acide par l'addition d'acide monoiodoacétique. La solution est ramenée à pH 6,0 par la solution de soude normale. Les coupes de différents organes ont été incubées dans cette solution pendant 30 minutes.

Effet de monoiodoacétate

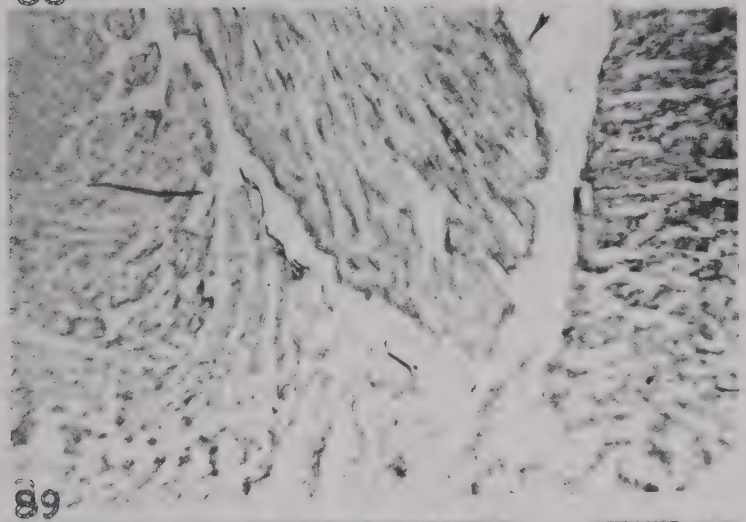
Figure 88 - Myocarde de rat; activité normale (Gr = 20 d)

Figure 89 - Coupe successive du même tissu. L'activité phosphorylasique après l'incubation dans le milieu contenant l'acide monoiodoacétique 0,01 M (Gr = 20 d)

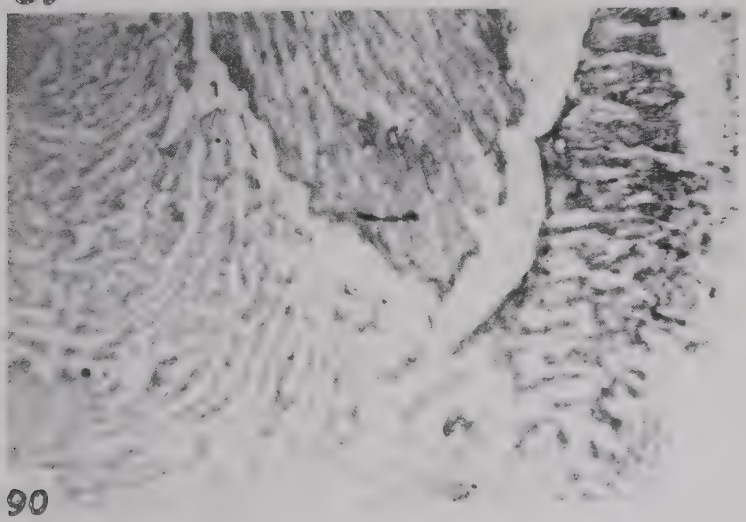
Figure 90 - Coupe successive du même tissu. L'activité après l'incubation dans le milieu contenant l'acide monoiodoacétique 0,02 M (Gr = 20 d)



88



89



90

Résultats

L'acide monoiodoacétique à la concentration de 0,01 M inhibe totalement l'activité phosphorylasique du foie, du muscle et du cerveau. L'activité de la phosphorylase du myocarde est seulement partiellement inhibée à cette concentration. L'inhibition n'était pas toujours complète lorsque la concentration de l'acide monoiodoacétique est élevée à 0,02 M (fig. 90).

EFFET DE L'ETHYLENEDIAMINE TETRAACETATE (EDTA)

La phosphorylase kinase, pour opérer la synthèse de la phosphorylase active exige la présence d'ions magnésium. Un chélateur d'ions magnésiumserait donc capable d'inhiber l'action de cette enzyme par la formation d'un complexe inactif. En effet, Fischer et Krebs (1955) avaient déjà remarqué que l'ethylénediamine tétraacétate (EDTA) inhibe le système de la transformation de la phosphorylase inactive (forme b) en phosphorylase active (forme a). Il semble, par conséquent, probable que la réaction de la phosphorylase totale soit empêchée par la présence d'EDTA, à cause de l'inhibition de la phosphorylase-kinase.

Pour nos expériences, nous avons ajouté au milieu d'incubation le sel tétrasodique de l'EDTA aux mêmes concentrations molaires que le sel de magnésium (0,0025 M soit 9,5 mg pour 10 cc du milieu). Le pH du milieu est ensuite ajusté à 6,0. Les conditions d'incubations et la mise en évidence sont identiques à celles qui ont été décrites précédemment. Le foie, le myocarde, et le muscle strié (muscle abdominal) ont été employés pour cette étude.

RESULTATS : Après l'incubation dans le milieu contenant l'EDTA, nous observons l'inhibition complète de la phosphorylase totale dans les organes de la plupart des animaux. Cependant, même après l'EDTA, une activité faible de cette phosphorylase totale persiste soit dans le foie, soit dans le myocarde, soit dans le muscle strié selon l'animal. Dans ces organes, la phosphorylase active préexistante est présente et son intensité est identique à celle de la phosphorylase totale après l'inhibition par EDTA.

L'inhibition par l'EDTA a été levée lorsque nous avons augmenté la concentration du sulfate de magnésium (0,1 M). L'inhibition par l'EDTA dans les coupes de muscle et de myocarde est également levée lorsqu'on ajoute 0,001 M d'AMP dans le milieu d'incubation.

La phosphorylase active préexistance n'est pas du tout inhibée par l'EDTA, même à une concentration de 0,005 M (19 mg pour 10 cc du milieu d'incubation). Contrairement à la constatation de Godlewski (1960 a), nous n'avons trouvé aucune augmentation de l'activité de la phosphorylase hépatique après addition de l'EDTA.

INTERPRETATION : D'après nos résultats, il est évident que l'EDTA inhibe complètement la réaction provoquée par la phosphorylase-kinase. Cette inhibition est complète lorsque les coupes sont totalement dépourvues de la phosphorylase active préexistante. Après l'incubation dans le milieu contenant l'EDTA, l'activité persistante de la phosphorylase totale dans certains organes serait dûe à la phosphorylase active préexistante. L'activation de la phosphorylase inactive par l'AMP n'est pas empêchée par l'EDTA. Ce phénomène indique une fois de plus que le mécanisme d'activation de la phosphorylase inactive par AMP est différent de celui de la phosphorylase kinase. Nos résultats infirment l'hypothèse de Godlewski (1960), selon laquelle la phosphorylase inactive du foie serait facilement mise en évidence lorsuq'on ajoute l'EDTA dans le milieu d'incubation.

Chapitre X

L'ACTIVITE PHOSPHORYLASIQUE CHEZ LES RATS SOUMIS A L'ANOXIE

Nous avons remarqué que le glycogène du foie et du myocarde est mobilisé chez les rats soumis à l'anoxie. Il nous a paru intéressant d'étudier le rôle joué par la phosphorylase dans cette mobilisation.

Les rats de 200 g en moyenne ont été utilisés pour nos expériences. Ils ont été sacrifiés dans une cage métabolique, hermétiquement close, par l'évacuation de l'air. La chaux sodée a été introduite dans la cage pour absorber le CC_2 de la cage afin d'empêcher l'asphyxie de l'animal par le gaz carbonique. Les rats étaient morts au bout de 45 minutes de la création du vide. Les rats, aussitôt morts ont été saignés par la section des carotides. Le coeur et le foie ont été vite prélevés.

Le foie et le coeur ont été coupés dans le cryostat et les coupes étaient incubées dans le substrat de la phosphorylase totale pendant 30 minutes. Le glycogène dans les coupes de ces organes a été décelé par la technique de l'acide periodique—Schiff de MacManus avec une épreuve amylasique.

RESULTATS

Dans tous les animaux soumis à l'anoxie, l'activité phosphorylasique dans le foie et dans le myocarde était complètement négative. La réaction de l'acide periodique Schiff avec l'épreuve à l'amylase a montré une dégradation totale du glycogène au niveau de ces tissus. Nous avons alors pensé que cette absence d'activité est due à l'absence de "primer" dans les tissus. Cette absence de "primer" (le glycogène au niveau des coupes) souvent montre une période ralentie de l'activité telle qu'elle a été observée dans les cas où le glycogène est dégradé par l'action des agents hyperglycémiants. Nous avons augmenté le temps d'incubation jusqu'à deux heures. Mais cette fois aussi l'activité phosphorylasique restait négative.

Les coupes du foie et du coeur des rats tués par l'azote n'ont pas présenté eux aussi d'activité phosphorylasique.

Deux rats tués par l'hyperoxygénation ont montré une activité phosphorylasique normale dans ces deux organes. La teneur de glycogène n'est pas perturbée par l'hyperoxygénation.

INTERPRETATION

L'anoxie entraîne une dégradation totale de glycogène hépatique et cardiaque. Wegmann et Tordet-Caridroit (Ann. Histochim., 1959, 4 : 245) ont observé une augmentation considérable de l'activité succino-déshydrogénasique, dans ces deux organes d'animaux soumis à l'anoxie. Il est donc bien évident que le glycogène est dégradé par la phosphorylation. Cette phosphorylation devait être réalisée par l'activation de la phosphorylase. Or, aucune activité phosphorylasique n'a pu être démontrée.

Nous avons déjà signalé que la présence du glycogène dans les coupes est nécessaire pour la synthèse du glycogène à partir du glucose-1-phosphate par la phosphorylase. Ce glycogène endogène sert comme "primer" ou matrice auquel des molécules du glucose prélevé sur le glucose-1-Phosphate sont ajoutées successivement. L'absence de glycogène dans ce cas pourrait donner naissance à une période ralentie. Mais il a été remarqué que même l'incubation prolongée ne peut supprimer la période ralentie. L'activité reste inchangée. Donc l'absence du glycogène n'est pas le facteur limitant pour l'activité de la phosphorylase.

L'hypothèse de l'inactivation de la phosphorylase par l'épuisement total de glycogène peut aussi être considéré. Sutherland et ses collaborateurs (1956) ont déjà remarqué que la phosphorylase purifiée du foie a une tendance à s'associer à la fraction glycogénique. La séparation de la protéine de la fraction glucidique entraîne une dénaturation de la protéine.

De plus il a été remarqué que, même chez les animaux normaux, il y a un antagonisme entre l'activité phosphorylasique et l'activité succino-déshydrogénasique. Lorsque la dernière enzyme est activée l'activité phosphorylasique est presque nulle ou négligeable. Le même antagonisme a été observé par Dubowitz et Pearse (1960a). L'activation de la succino-déshydrogénase, dans ce cas peut aussi expliquer l'absence de l'activité phosphorylasique.

Chapitre XI

EFFET DES VIBRATIONS INFRASONORES

Les vibrations ultrasonores ont fait l'objet de plusieurs recherches physiologiques. Mais l'action des vibrations infrasonores sur l'organisme est encore méconnu. Récemment, Grognot, Senelar et Loubière (1959) ont remarqué que les vibrations infrasonores de 7 Hz et d'intensité variant entre 174 et 190 dB après des expositions comprises entre 7 et 20 minutes, provoquent des lésions pulmonaires chez les rats.

Nous avons étudié le comportement de la phosphorylase sous l'influence des infrasons sur les rats et les cobayes soumis aux infrasons.

MATERIEL ET METHODE

L'appareillage utilisé a été réalisé par Finchow. Cet appareil se compose d'une chambre cubique dont une paroi est mobile et animée d'un mouvement de va-et-vient, ce qui crée des variations de pression atmosphérique dans l'enceinte close. L'animal en expérience est placé au centre de l'enceinte. Une came de réglage permet de régler l'intensité et la fréquence des infrasons produits. Un thermocouple permet de relever constamment la température de l'enceinte pendant la durée de l'expérience. Cette température ne dépasse jamais 28°C.

Les rats blancs femelles et les cobayesfemelles ont fait l'objet de cette étude. Le foie, le poumon et l'utérus ont été examinés pour l'activité phosphorylasique. Les animaux ont été soumis à l'action des vibrations infrasonores d'une fréquence de 22 Hz et d'intensité de 130 dB pour une période variant entre 21 heures et 118 heures.

Après l'expérimentation, les animaux,immédiatement sacrifiés, ont fait l'objet de prélèvements des organes.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau XI

Activité phosphorylasique dans les organes des animaux soumis aux infrasons

Animal	Temps d'exposition	Intensité dB	Fréquence Hz	Phosphorylase		
				Foie	Utérus	Poumon
Rat n° 1	84 heures	130	22	Faible	Normale	Normale
Rat n° 2	87 heures	"	"	Normale	Normale	Normale
Rat n° 3	84 heures 45	"	"	Normale	Faible	Normale
Rat n° 4	65 heures	"	"	Normale	Normale	Normale
Rat n° 5	26 heures	"	"	Absente	----	Normale
Rat n° 6	61 heures	"	"	Normale	Normale	Normale
Rat n° 7	118 heures 15	"	"	Modérée	Normale	Normale
Rat n° 8	68 heures	"	"	Normale	Presque absente	Normale
Rat n° 9	21 heures	"	"	Normale	Normale	Normale
Rat n° 10	24 heures 45	"	"	Normale	Normale	Normale

D'après le tableau il est évident que les infrasons ne perturbent pas l'activité phosphorylasique dans les organes étudiés. Les cobayes qui ont reçu un temps d'exposition de 65 heures n'ont pas montré un changement quelconque de l'activité (à 123 dB) de la phosphorylase hépatique. Chez les rats la phosphorylase est toujours présente dans leur localisation habituelle par exemple dans la région périlobulaire du foie, dans la couche musculaire de l'utérus et dans la paroi vasculaire et dans les bronches.

Chapitre XII

EFFET IN VIVO DU GLUCAGON

Le glucagon ou facteur hyperglycémiant-glycogénolytique "Hyperglycemic-glycogenolytic factor" (HGF) est une hormone présente dans les extraits pancréatiques de diverses espèces animales. Cette hormone est difficile à séparer de l'insuline. Elle se distingue de l'insuline et des autres hormones hyperglycémiantes par les propriétés suivantes : a) non dialysable ; b) résiste à une incubation dans les milieux fortement alcalins (NaCH ou KCH 0,1 M) ; c) résiste à l'incubation en présence de cystéine ; d) se dégrade par les enzymes protéolytiques telles que la trypsine ; e) absence d'influence de l'ergotamine sur l'activité biologique tant in vivo qu'in vitro (De Duve et Berthet 1957).

Pour les histologistes, cette hormone hyperglycémiante serait sécrétée par les cellules A des ilots de Langerhans (Verne 1957). Découvert en 1923, le glucagon n'a pas éveillé pendant longtemps l'intérêt des biochimistes. Depuis 1945, les recherches sur le glucagon ont abouti à sa purification et à l'élucidation de sa structure chimique.

Plusieurs auteurs ont remarqué que le glucagon réagit essentiellement sur le foie. L'excès du glucose dans le sang, provoqué par l'administration du glucagon, provient exclusivement du glycogène hépatique. Chez les animaux hépatectomisés aucun effet du glucagon n'a été remarqué. Un rapport direct entre la diminution du glycogène hépatique et l'augmentation du glucose sanguin a été confirmé par plusieurs chercheurs biochimistes (Berthet et collaborateurs 1956 ; Cahill et collaborateurs 1957).

Dès 1951, Sutherland et Cori ont précisé que le glucagon agit par une activation spécifique de la phosphorylase tant in vitro qu'in vivo. Les autres enzymes de la glycogénolyse telles que la phosphoglucomutase et la glucose-6-phosphatase ne sont pas activées (Sutherland et Cori C.F. 1951). Le glucagon n'a pas d'effets sur la phosphorylase musculaire (Cori G.T. et Illingworth 1956).

Malgré ces nombreuses études biochimiques, le glucagon n'a pas suscité l'intérêt des histochimistes. Aucune étude histochimique sur l'effet du glucagon, ni sur le glycogène, ni sur la phosphorylase, n'a été réalisée jusqu'à maintenant.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'effet du glucagon sur la phosphorylase et sur le glycogène hépatique dans le plan morphologique.

La technique employée par nous permet d'étudier le rapport entre la forme active et la forme inactive de la phosphorylase. Il nous a donc paru également intéressant de voir si le glucagon augmente la concentration de la phosphorylase active ou si son influence se manifeste aussi sur la phosphorylase totale.

L'étude de la phosphorylase et du glycogène a été poursuivie chez le lapin (poids moyen 3 kg). Le foie de ces animaux et le muscle, le rein et le myocarde de quelques-uns de ces animaux ont été utilisés pour cette étude.

Le glucagon, dissout dans une solution de Ringer, a été administré par la voie intraveineuse.

- Un premier lot a reçu une dose unique de glucagon de 250 µg à 2500 µg. Les animaux ont été sacrifiés et saignés 30 minutes après l'injection.

- Un deuxième lot de 3 animaux a reçu une dose de 2,500 µg de glucagon réparti en quatre injections à un intervalle de 3 heures. Les animaux ont été sacrifiés 30 minutes après la dernière injection.

- Un troisième lot de six animaux a reçu 15 injections réparties en 5 jours. Chaque jour ils recevaient trois injections à un intervalle de 4 heures. Ils ont été sacrifiés 30 minutes après la dernière injection. Les organes non-fixés ont été coupés dans le cryostat.

- La technique de l'acide periodique Schiff (PAS) de Hotchkiss et McManus avec une épreuve amylasique a été employée pour la mise en évidence du glycogène.

- La phosphorylase active a été décelée par l'incubation dans le milieu contenant le glucose-1-phosphate et le fluorure de sodium seulement.

- La phosphorylase totale a été décelée par l'addition d'ATP et de sel de magnésium dans le milieu précédent.
  Le temps d'incubation a été prolongé parfois jusqu'à 2 heures.

Les lapins qui ont reçu une dose de 250 µg, soit 85 µg/kg de glucagon montrent une glycogénolyse hépatique inconstante. Toutefois le glycogène périphérique des lobules hépatiques est la première à diminuer. La phosphorylase active augmente dans la région où la diminution du glycogène est maxima. Les images de ces deux réactions sont superposables (fig. 91 et 92).

Les lapins obtenant une dose de 600 µg (200 µg/kg) montrent une diminution périlobulaire de glycogène. Il y a une légère diminution du glycogène centro-lobulaire. La phosphorylase active augmente dans le lobule entier. La phosphorylase totale n'a apparemment subi aucun

changement. Les lapins ayant reçu une dose de 2,500 µg présentent une forte diminution du glycogène de la lobule. Ici aussi la diminution du glycogène périlobulaire est plus prononcée. La phosphorylase active est considérablement augmentée dans le premier cas (fig. 93). La phosphorylase totale augmente elle aussi légèrement (fig. 94).

Les lapins ayant reçu une dose totale de 2,500 µg répartie en 4 injections pendant la journée ont un foie presque complètement vidé de son glycogène. Quelques rares cellules dans les travées conservent encore une charge glycogénique. Dans cette condition la phosphorylase totale diminue considérablement et l'intensité de la phosphorylase totale et de la phosphorylase active devient identique; ce qui indique que la phosphorylase est totalement transformée en forme active pour la mobilisation du glycogène.

Sur les animaux qui ont obtenu une dose totale de 7,500 µg répartie en 5 jours, on a pu observer une diminution du glycogène. C'est encore la région périlobulaire qui manifeste le maximum de diminution glycogénique. La phosphorylase totale est normale chez ces animaux. Une activité faible de la phosphorylase active est décelée chez quelques-uns de ces animaux. Ceci démontre que la phosphorylase inactive redevient la forme prédominante (fig. 95 et 96).

Malgré la généralité de ces résultats obtenus, une variation individuelle est observée dans tous les lots d'animaux étudiés.

L'enzyme de la paroi vasculaire du foie n'a pas été modifiée sous l'influence du glucagon.

La phosphorylase active des autres organes tels que le muscle, le myocarde et le rein n'a pas augmenté sous l'influence du glucagon.

DISCUSSION

La dégradation in vivo du glycogène résulte d'une augmentation de la phosphorylase active. Cette augmentation de la forme active n'est pas nécessairement traduite par une augmentation de la phosphorylase totale (forme active et forme inactive). La glycogénolyse hépatique peut simplement être interprétée par le changement du rapport entre la forme active et la forme inactive.

La technique employée par nous permet de différencier l'activité de la forme active et de la phosphorylase totale. La perturbation du rapport entre les deux formes phosphorylasiques, provoquée par les agents glycogénolytiques, peut être facilement étudiée par cette technique.

Nos résultats sur les animaux qui ont obtenu une dose unique confirment les résultats obtenus par les recherches biochimiques (Sutherland et Cori 1951 ; Cahill et Earle 1956).

Mais nos observations morphologiques démontrent contrairement à la constatation de Kibler, Taylor et Myers (1952), la glycogénolyse que périlobulaire précède la glycogénolyse centrolobulaire. Ces derniers auteurs ont montré par cathétérisme de la veine sus-hépatique que l'hyperglycémie y est plus précoce et plus prononcée que la réponse périphérique.

Nos essais d'injections répétées de glucagon confirment la constatation de Cahill et de ses collaborateurs (1957) relative à l'épuisement presque complet du foie. La diminution de la phosphorylase, telle qu'elle a été observée par ces auteurs, est aussi confirmée par nos études histochimiques.

Il paraît qu'après le traitement des animaux par le glucagon durant 5 jours, l'activité phosphorylasique redevient normale. Dans le dernier cas, la raison pour laquelle on ne constate point de rapport inverse entre la diminution glycogénique et l'augmentation de la forme active de la phosphorylase n'est pas élucidée.

Effet du glucagon

Figure 91 - L'activité de la phosphorylasique active hépatique chez le lapin traité par 250 µg de glucagon (85 µg/kg).

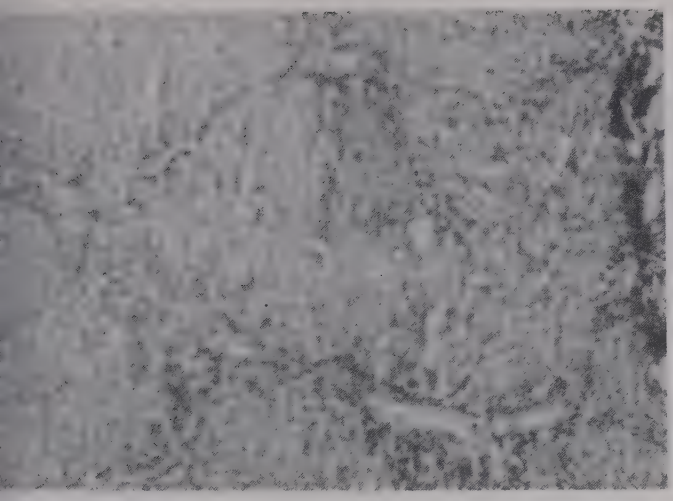
Figure 92 - Glycogène dans la coupe successive du même foie démontrant la diminution du glycogène dans la région périlobulaire. Les zones de la diminution du glycogène et de l'activation de la phosphorylase sont superposables.

Figure 93 - Phosphorylase active du foie de lapin. L'animal a reçu une dose unique de 2,500 µg de glucagon.

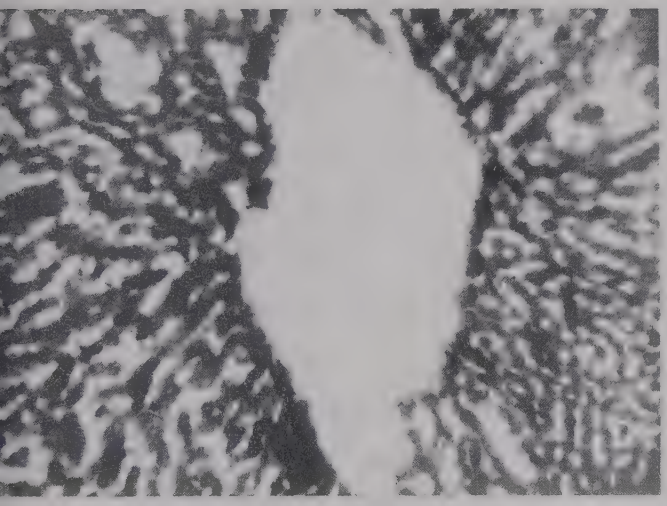
Figure 94 - Phosphorylase totale dans la coupe successive du même foie. L'intensité de la réaction est presque identique à celle de la phosphorylase active.

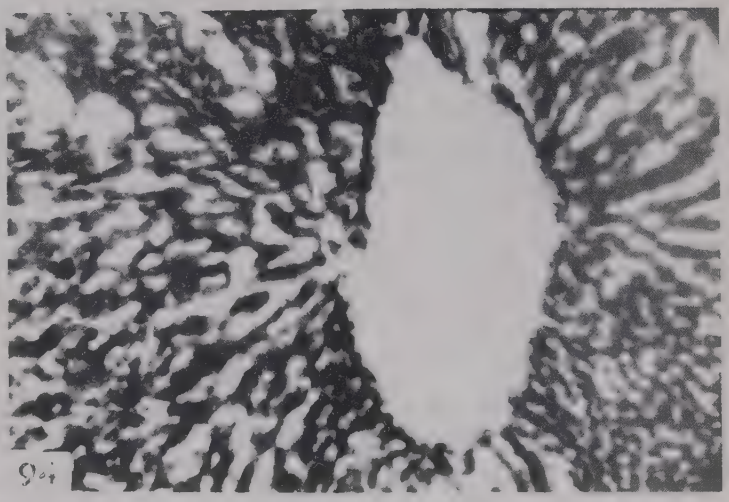
Figure 95 - Phosphorylase active du foie de lapin. L'animal a reçu le glucagon pendant 5 jours.

Figure 96 - Phosphorylase totale dans la coupe successive du foie de la figure 95. L'activité est beaucoup plus intense que la phosphorylase active.

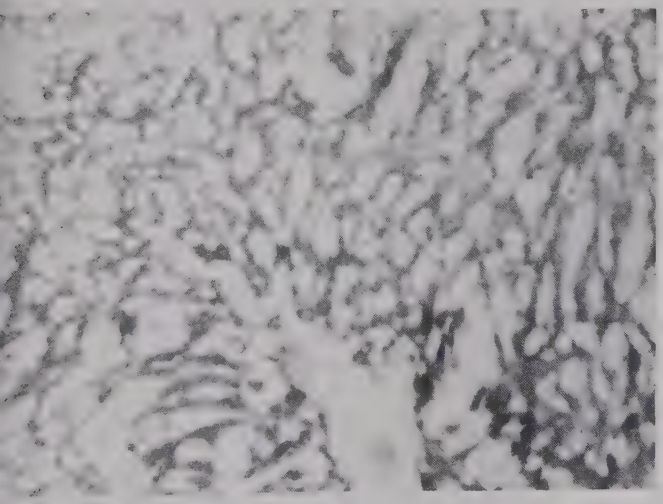


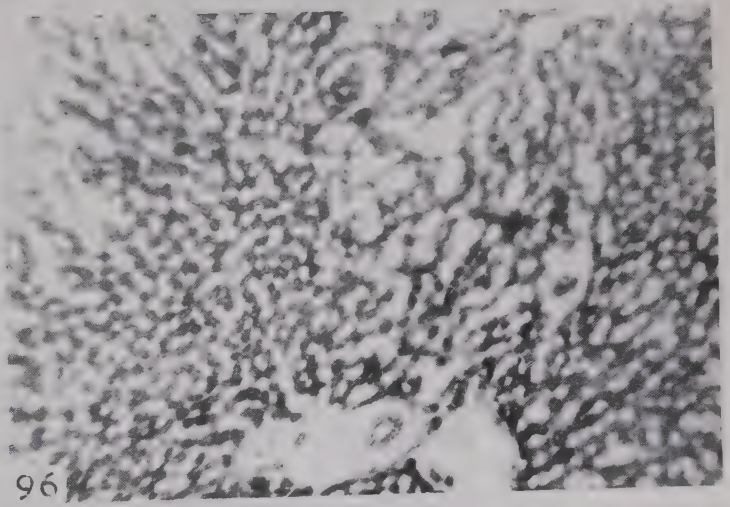
92





94





96

Chapitre XIII

INTERPRETATION GENERALE ET APPRECIATION CRITIQUE DES TECHNIQUES ANTERIEURES

Krebs et ses collaborateurs (1955) ont constaté que la forme inactive de la phosphorylase prédomine sur la forme active dans le muscle à l'état de repos.

Nos expériences ont montré que l'activité de la phosphorylase ne peut guère être démontrée sans activation de la phosphorylase kinase. Ce fait signale que, dans les conditions histochimiques, la forme prédominante de la phosphorylase est la forme inactive, non seulement dans le muscle mais aussi dans d'autres organes. Il faut cependant signaler que, si Cori (1956) a trouvé dans quelques organes tels que le coeur, la forme active est la forme prédominante, d'après nos observations la forme inactive y existe dans les mêmes proportions. Ce fait est confirmé par l'étude biochimique de Haugaard et collaborateurs (1959).

Dans les conditions d'études histochimiques, le tissu subit un refroidissement et la coupe de tissu, un réchauffement (voir préparation de coupes). Il paraît que ce refroidissement et ce réchauffement déplacent l'équilibre des deux formes vers la forme inactive. En effet, De Duve et ses collaborateurs (1957) ont remarqué qu'une simple congélation est suffisante pour inactiver la phosphorylase du foie. On peut se demander si cet équilibre n'est pas déjà déplacé pendant le prélèvement des organes. Nous avons alors refroidi l'un des deux muscles droits femoraux du rat in situ par le gaz carbonique. Nous avons trouvé que l'activité dans le muscle refroidi in situ et dans le muscle non refroidi, avant le prélèvement, est identique contrairement à la constatation de Cori (1956) qui a trouvé une augmentation de la forme active dans le muscle refroidi in situ. Cependant, nous avons remarqué que parfois après une conservation prolongée des tissus à -30°C la phosphorylase active peut être facilement démontrée.

Puisque la forme inactive prédomine au niveau des tissus normaux, la transformation ou l'activation de la phosphorylase inactive devient nécessaire pour démontrer l'activité de la phosphorylase totale.

Dans certaines conditions expérimentales la teneur de la phosphorylase active est considérablement augmentée. En ce cas, la phosphorylase active peut être démontrée par la technique proposée pour la "phosphorylase active-préexistante". Ceci permet de déterminer l'activité de phosphorylase active par rapport à l'activité de la phosphorylase totale.

Jusqu'à maintenant on ne sait pas sous quelle forme la phosphorylase est active dans les cellules vivantes. On ignore aussi tout de la modalité d'activation in vivo de la phosphorylase. Krebs et ses collaborateurs (1957) ont observé que l'activation de la phosphorylase b (forme inactive) du muscle par l'AMP est un phénomène indépendant et qui n'a aucun rapport avec le processus de la transformation de la phosphorylase b en forme a (forme active). Cette transformation est effectuée par la phosphorylase-kinase en présence de l'ATP et d'ions Mg^{++}.

De plus, Fischer et ses collaborateurs (1955) et Illingworth et ses collaborateurs (1958) ont observé que la nécessité d'AMP de la phosphorylase diminue progressivement avec l'activation de la phosphorylase kinase. On attribuait autrefois le rôle de groupe prosthétique de la phosphorylase à l'AMP. Mais depuis le début des études phosphorylasiques on a signalé que la quantité d'AMP nécessaire pour l'activation sous-maximale n'existe pas dans le muscle in vivo (Motchnaka et Parnas 1936). La découverte de Baranowski et ses collaborateurs (1957) et les recherches de Cori et ses collaborateurs (1958) montrant que le vrai groupe prosthétique de la phosphorylase est le pyridoxal-5-phosphate, a mis fin aux spéculations sur le rôle du groupe prosthétique de l'AMP. Rappelons encore que l'AMP est même incapable d'activer la phosphorylase inactive du foie. Tenant compte de l'ensemble de ces faits on a le droit de douter du rôle d'activateur de l'AMP dans les conditions physiologiques.

Les études biochimiques ont démontré l'existence de la phosphorylase-kinase dans le muscle, dans le myocarde, dans le foie et dans la surrénale des animaux normaux. On peut se demander si cette kinase existe aussi dans d'autres organes. La réponse est apportée par nos études. La technique de mise en évidence de la phosphorylase, qui est basée sur l'activation de la phosphorylase-kinase révèle l'existence de cette kinase non seulement dans le muscle ou dans le foie mais aussi dans d'autres organes tels que l'utérus, le cerveau, le rein, le cartilage, la peau et les organes qui contiennent normalement la phosphorylase. Ceci nous amène à croire que la phosphorylase, dans les conditions physiologiques, est activée par la phosphorylase kinase.

Dans ce cas, nous avons de fortes présomptions pour admettre que la technique proposée par nous soit la plus rapprochée des conditions physiologiques et qu'elle reflète mieux que les autres techniques le véritable fonctionnement de ce système.

On peut se demander si la réaction proposée par nous pour la mise en évidence de la phosphorylase totale résulte vraiment de l'activation de la phosphorylase kinase ou si elle se produit par suite de la dégradation de l'ATP (qui est utilisé dans notre milieu d'incubation) en AMP qui à son tour, active la phosphorylase inactive.

Evidemment, dans les conditions histochimiques aucune preuve directe ne peut être fournie. Mais les faits suivants nous permettent de conclure que la mise en évidence de cette activité est dûe à l'activation spécifique de la phosphorylase kinase et non à l'AMP.

Tout d'abord, l'activation de la phosphorylase inactive du foie prouve que cette activation ne résultait point de l'AMP, puisque la forme inactive de la phosphorylase hépatique n'est pas activée en présence d'AMP.

Ensuite, l'étude de la variation de cette activité en fonction de pH a démontré la différence entre ce système d'activation et l'activation par l'AMP. L'activité phosphorylasique dans le muscle est évidente même à pH 4,0 (Takeuchi et Kuriaki, 1955) en présence d'AMP, tandis que l'activité phosphorylasique observée dans le milieu contenant l'activateur de la phosphorylase kinase seulement, présente une chute brusque de l'activité au dessous de pH 6,0 et cette activité n'a jamais pu être décelée au-dessous de pH 5,0. L'apparition de cette activité même au-dessous de pH 5,0 est remarquée lorsque l'AMP est ajouté dans ce milieu d'incubation. Ce phénomène prouve que l'activation de la phosphorylase par la phosphorylase kinase est spécifique.

La preuve la plus convaincante est apportée par l'étude de l'effet de l'EDTA sur l'activité de la phosphorylase totale. L'activation de la phosphorylase inactive par la phosphorylase kinase est complètement inhibée par l'EDTA, tandis que l'activation de la phosphorylase inactive par l'AMP n'est pas inhibée. Ce phénomène indique clairement que le mécanisme d'activation de la phosphorylase par la phosphorylase-kinase est bien différent de celui qu'on obtient par l'AMP. Si l'ATP dans notre milieu d'incubation était dégradé en AMP, l'inhibition par l'EDTA ne se manifesterait pas, ce qui n'est pas le cas. Tenant compte de ce fait, nous admettons que l'EDTA, ajouté dans notre milieu d'incubation, empêche la transformation de la phosphorylase inactive en forme active en inhibant spécifiquement la phosphorylase kinase.

L'enzyme branchante réagit concuremment avec la phosphorylase. En effet,l'activité phosphorylasique détermine l'activité de l'enzyme branchante. Celle-ci est incapable de réagir de manière indépendante. Nous n'avons pu trouver un inhibiteur spécifique pour l'enzyme branchante qui n'inhiberait point la phosphorylase. Les inhibiteurs spécifiques de l'enzyme branchante, recherchés par Takeuchi (1958), inhibent partiellement la phosphorylase. Par cette inhibition la phosphorylase devient incapable de synthétiser des chaînes amylosiques de longueur suffisante pour le transfert par la transglycosylase. Dans ces cas l'enzyme branchante reste inactive par manque de substrat (chaîne amylosique de longueur déterminée). L'action de ces agents inhibiteurs est donc seulement secondaire sur "branching enzyme".

Le seul moyen pour discriminer le polysaccharide synthétisé par la phosphorylase seule du polysaccharide synthétisé par la phosphorylase et par enzyme branchante consiste en une post-digestion du polysaccharide néoformé par l'amylase ou par la phosphorylase. La post-digestion par la β amylase a été déjà utilisée par Takeuchi (1958).

Quelques auteurs, surtout Ellis et Montagna (1958) ont fait une distinction entre l'activité de la phosphorylase et l'activité de l'enzyme branchante par la couleur à l'iode des polysaccharides néo-formés. Selon ces auteurs, la coloration rouge-brune signale l'activité de l'enzyme branchante tandis que la coloration bleue indique l'activité de la phosphorylase seule.

Il faut cependant signaler que même les chaînes amylosiques donnent les colorations différentes à l'iode selon la longueur de la chaîne synthétisée par la phosphorylase. Cette coloration varie entre le rouge ou rouge-brun et le bleu pour les chaînes amylosiques de 8 à 35 molécules de glucose (Swanson 1948 ; Bernfeld 1951). D'ailleurs nous avons remarqué que la coloration brune de l'assise basale de l'épiderme de la peau humaine est due uniquement à la phosphorylase contrairement à ce qui a été considéré par Ellis et Montagna (1958). Tenant compte de ce fait nous pouvons dire qu'une interprétation de l'activité de l'enzyme branchante par la coloration à l'iode peut facilement induire en erreur. Une chaîne amylosique de longueur insuffisante, synthétisée par l'activité ralentie de la phosphorylase peut être interprétée comme une activité de l'enzyme branchante, si elle n'est pas contrôlée par une des deux méthodes de post-digestion.

L'absence de la nécessité du glycogène comme primer dans les conditions histochimiques pose une énigme. Les chercheurs biochimistes considèrent la présence du glycogène exogène comme essentiel pour la synthèse du glycogène par la phosphorylase in vitro. En effet Cohn et Cori (1948) ont remarqué que la phosphorylase cristallisée ne réagit pas pour la synthèse du glycogène, lorsque le glycogène est absent dans le milieu d'incubation. Pour la phosphorylase de l'extrait tissulaire l'absence du glycogène exogène provoque une période de latence (Cori et Cori 1939). On peut se demander de quelle manière, dans les conditions histochimiques, la phosphorylase peut réagir sans le primer et sans avoir le ralentissement initial tel qu'il a été observé par Cori et Cori (1940) et par Hanes (1940 a).

Nous ne sommes pas les premiers à observer que l'activité de la phosphorylase n'est pas diminuée même en absence du glycogène dans le milieu d'incubation. Goldberg et ses collaborateurs (1952-53) et Takeuchi (1958) ont déjà remarqué ce phénomène. Mais aucun de ces auteurs n'a fourni une explication quelconque. Selon Takeuchi et Kuriaki (1955) le polysaccharide synthétisé au niveau des coupes par la phosphorylase est de poids moléculaire assez bas.

Dans l'étude de l'effet in vivo du glucagon nous avons remarqué que le glycogène hépatique est presque totalement épuisé par l'injection successive du glucagon. Dans cette condition, l'activité phosphorylasique ne peut être démontrée par une incubation normale d'une demi-heure. Mais lorsque le temps d'incubation est prolongé jusqu'à 2 heures l'activité de la phosphorylase paraît normale ou légèrement diminuée. Ce phénomène indique nettement que la diminution du glycogène endogène (au niveau de la coupe) provoque cette latence initiale qui a été déjà remarquée par les biochimistes.

Il nous paraît probable que dans la réaction histochimique, le glycogène endogène provenant de la coupe sert comme primer pour la synthèse du glycogène sous l'influence de la phosphorylase. Les chaînes latérales de glycogène des coupes doivent être allongées par l'addition successive des molécules du glucose provenant du glucose-1-phosphate sous l'influence de la phosphorylase. Mais à ce moment les limitations techniques ne nous permettent pas d'apporter une preuve en faveur de cette hypothèse.

Récemment Kugler et Wilkinson (1959, 1960) ont remarqué que parmi les deux fractions glycogéniques existant dans les organes, la fraction soluble à l'acide trichloracétique qui est métaboliquement plus active peut être démontrée par les techniques histochimiques. L'autre fraction glycogénique qui est insoluble à l'acide trichloracétique et qui ne réagit qu'avec un certain retard dans le métabolisme glucidique n'est pas démontrée par les techniques histochimiques (Kugler et Wilkinson 1960). Nous ne savons pas exactement quelle fraction glycogénique sert comme primer ou matrice dans la réaction phosphorylasique. Mais puisque le glycogène néo-formé peut aussi être démontré par la technique de McManus (PAS), nous nous permettons de présumer qu'il s'agit de la fraction soluble à l'acide trichloracétique.

L'étude de la fixation a montré que la destruction de l'enzyme n'est pas provoquée par les fixateurs tels que l'acétone et l'éthanol absolu. Ce sont plutôt les étapes de la préparation des coupes à la paraffine qui sont responsables de la destruction de cette enzyme. Malgré ceci, pour obtenir la réaction optimale, des coupes fraîches de tissus non-fixés doivent être employées. La raison d'apparition d'une activité dans les noyaux des cellules hépatiques après la fixation de l'alcool, n'est pas comprise.

Les études de l'activation par le 5-AMP et par le 3,5-AMP cyclique confirment les constatations des auteurs d'études biochimiques de Rall, Berthet et Sutherland (1957).

L'étude de l'effet de l'insuline a démontré que l'insuline n'a aucun effet activateur sur la phosphorylase contrairement aux constatations de Takeuchi et Kuriaki (1955). Selon ces auteurs l'addition de l'insuline dans le milieu d'incubation peut intensifier la réaction de la phosphorylase.

L'étude de l'activation par la protamine a démontré de quelle façon l'étude histochimique peut suppléer à l'étude biochimique et corriger les erreurs biochimiques dues aux techniques employées. Krebs (1954) a constaté une inactivation de la phosphorylase par la protamine à faible concentration et une diminution progressive de cette inhibition lorsque la concentration de la protamine est augmentée. Selon Madsen et Cori (1954) cette inhibition initiale est due à une précipitation du complexe catalytiquement actif de la phosphorylase et de protamine. Avec l'augmentation de la concentration de la protamine ce précipité du complexe phosphorylase-protamine entré en solution et en conséquence, l'inhibition diminue.

Dans ces conditions histochimiques la formation d'un complexe enzymatique insoluble mais catalytiquement actif est une condition favorable pour démontrer l'activité de l'enzyme. Ceci démontre que le vrai rôle de la protamine est celle d'un activateur de cette enzyme et non d'un inhibiteur tel qu'il a été observé par Krebs.

L'étude de l'effet des agents réducteurs, par contre, démontre quelques limitations des études histoenzymologiques. La solubilité augmentée d'une enzyme est une condition défavorable pour l'étude enzymo-morphologique contrairement à l'étude biochimique. Cette étude démontre plus particulièrement que les résultats apparemment en contradiction avec les résultats biochimiques peuvent facilement induire l'histochimiste à des erreurs si ces résultats ne sont pas interprétés avec précaution et sous contrôle biochimique.

L'étude de l'action de l'héparine a démontré qu'elle n'a aucune action inhibitrice ni sur la phosphorylase ni sur la phosphorylase kinase malgré son action antagoniste de celle de la protamine dans quelques conditions physiologiques (coagulation du sang).

La phosphorylase tout d'abord n'a pas été considérée comme un "SH-enzyme" par Guzmann-Barron (1943). Mais les études de Madsen et ses collaborateurs (1956 a, b) ont démontré que cette enzyme a besoin des groupes SH pour son activité et dans ce sens elle peut être considérée une "SH-enzyme". Nos études de l'action du PCMB sur la phosphorylase, par suite de difficultés techniques, n'ont pu prouver la nécessité des groupes SH dans l'activité enzymatique de la phosphorylase. Mais la preuve de la nécessité des groupes SH est apportée par l'étude de l'effet de l'acide monoiodoacétique sur la phosphorylase.

L'une des premières études sur l'effet des infrasons chez les animaux n'a pas montré une perturbation de l'activité phosphorylasique dans les organes.

En 1939, G. T. Cori et C. F. Cori ont remarqué que la phosphorylase in vitro peut facilement synthétiser le glycogène. Depuis ce jour on considéra que la phosphorylase (avec l'enzyme branchante) est l'enzyme de la synthèse et de la dégradation du glycogène. Mais, dans plusieurs cas in vivo, on a pu observer que la synthèse du glycogène n'était apparemment pas influencée par la phosphorylase. Par exemple, le glycogène pouvait être présent dans l'oeuf même en absence de la phosphorylase (voir discussion de Cori dans Stetten et Stetten, 1957).

La découverte de Sutherland et de ses collaborateurs que la phosphorylase activée par l'adrénaline ou le glucagon a, in vivo, un effet essentiellement glycogénolytique, a mis en doute la possibilité d'une synthèse du glycogène par cette voie.

L'existence d'une autre voie de synthèse enzymatique du glycogène, soupçonnée antérieurement, fut confirmée par la découverte de l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase (Leloir et Cardini, 1957). De plus, l'absence de la phosphorylase dans la maladie métabolique du glycogène ou la glycogénose tant dans le muscle (Mommaerts et Coll., 1959 ; Schmid et Coll., 1959) que dans le foie (Lamy et Coll., 1960) renforçait l'hypothèse que la phosphorylase intervient essentiellement dans la glycogénolyse, tandis que l'UDPG-glycogène transférase réalise la synthèse du glycogène.

De manière générale, on considère qu'in vitro, l'activité phosphorylasique est réversible et qu'elle fonctionnerait plutôt dans le sens de la synthèse que de la dégradation, opinion partagée par les biochimistes, même par ceux qui pensent que cette réaction phosphorylasique n'est pas réversible in vivo.

Malgré l'abondance des preuves en faveur de la théorie de l'action uniquement glycogénolytique de la phosphorylase, certaines recherches indiquent que la synthèse du glycogène peut aussi être associée avec l'augmentation de l'activité phosphorylasique. Leonard (1958) et Bo (1959) signalent l'activation de la phosphorylase de l'utérus sous l'influence de l'oestrogène. L'oestrogène augmente la concentration du glycogène utérin. Hess, Shaffran et Everitt (1960) ont remarqué une augmentation de l'activité phosphorylasique du foie sous l'influence de la cortisone. Même récemment, Brown, Illingworth et Cori (1961) ont envisagé la possibilité de la synthèse de novo du glycogène par la phosphorylase.

Dans nos études de l'effet in vivo du glucagon, nous avons remarqué que la glycogénolyse provoquée par cette hormone stimule la phosphorylase. Même dans les tissus apparemment normaux, nous avons remarqué que la diminution du glycogène est souvent traduite par l'augmentation de la phosphorylase active. Ces phénomènes nous permettent de penser que la phosphorylase est peut-être l'enzyme principale de la dégradation du glycogène. Mais l'action de l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase est extrêmement lente et l'augmentation spécifique in vivo, de cette enzyme par les agents glycogénétiques est encore à prouver.

De plus, les arguments présentés par les auteurs indiqués ci-dessus ne nous permettent pas de rejeter sans autre forme de procès la possibilité d'une synthèse au moyen de la phosphorylase. C'est pourquoi nous considérons toujours la phosphorylase comme une enzyme de la synthèse et de la dégradation du glycogène.

TECHNIQUES ANTERIEURES

Yin et Sun (1947) sont les premiers à employer sur les coupes des tissus végétaux une technique de détection histochimique de la phosphorylase. Les résultats furent concluants, mais il ne semble point que ces travaux ont retenu l'attention qu'ils méritaient. Il faut reconnaître que l'existence d'une seule forme de phosphorylase, de la phosphorylase active, dans les tissus végétaux, avait favorisé et simplifié ces recherches, mais dans aucun cas ces données n'avaient été directement transposables à l'étude des tissus animaux. L'existence de deux formes de phosphorylase, l'une active et l'autre inactive, avait beaucoup compliqué les recherches histochimiques au niveau des tissus animaux.

Cobb en 1953 a employé la technique de Yin et Sun sur l'os "frozen-dried". Les pièces d'os avant d'être coupées ont été incluses dans "carnauba wax". Avant l'incubation dans la solution du glucose-1-phosphate les coupes ont subi une série de prétraitements prolongés afin de les débarrasser du glycogène (par la digestion avec l'amylase α), des sels minéraux et de la phosphoglucomutase. Mais nous avons remarqué que dans les coupes de tissus non-fixés cette enzyme existe dans un état plus ou moins soluble. Le simple prétraitement dans une solution tamponnée est capable d'enlever cette enzyme au niveau des coupes. Burstone (1958) a observé une solubilité semblable pour les enzymes dans les coupes des tissus préparés par "freezing-drying". En ce cas il ne nous paraît pas probable que cette enzyme soit conservée au niveau des coupes après les prétraitements prolongés tels qu'ils ont été pratiqués par Cobb (1953). Ensuite la présence du glycogène est nécessaire comme primer dans la réaction phosphorylasique. Nous avons déjà constaté que le glycogène préexistant des coupes sert de primer à l'activité phosphorylasique dans les conditions histochimiques. Cobb n'ajoute pas de glycogène dans le milieu d'incubation et le glycogène endogène est digéré par l'amylase α avant la réaction phosphorylasique. En conséquence les coupes manquent de polysaccharide nécessaire pour la réaction de la phosphorylase.

Tenant compte de l'ensemble de ces deux faits, il nous paraît improbable que la réaction pratiquée par Cobb soit capable de démontrer l'activité phosphorylasique au niveau des coupes.

Goldberg, Wade et Jones (1952-53) ont recherché l'activité phosphorylasique dans les tissus animaux. Ils ont employé un milieu contenant, à part le substrat, le fluorure de sodium (0,1 M). Le fluorure de sodium a été employé afin d'inhiber les phosphatases non spécifiques qui peuvent intervenir dans la réaction phosphorylasique. Ils ont mis cette activité en évidence par une suite des réactions, PAS ou carmin de Best, ou vapeur à l'iode, pour la visualisation du polysaccharide néoformé. Ils ont aussi employé une modification de la technique de

Gomori pour les phosphatases acides. Mais leurs recherches n'ont eu qu'un succès partiel et ces auteurs n'ont pu trouver les causes des irrégularités de l'activité phosphorylasique.

Selon Takeuchi, Higasi et Watanuki (1955) la technique de Goldberg et ses collaborateurs ne décèle que des phosphatases acides et que le polysaccharide préexistant. Mais nos observations ne nous permettent pas de soutenir cette hypothèse.

Nos expériences ont démontré que la technique de Goldberg et ses collaborateurs est capable de déceler l'activité (par coloration à l'iode) de la phosphorylase active préexistante. Mais cette forme est rarement présente dans les tissus. C'est ce point qui était la cause des irrégularités de l'activité phosphorylasique rencontrées par Goldberg et ses collaborateurs. La technique que nous employons pour la recherche de la phosphorylase active préexistante peut, en effet, être considérée comme une modification de la technique de Goldberg et ses collaborateurs. Cependant il faut signaler que nous n'avons pu trouver une activité phosphorylasique au niveau de la partie proximale des tubes contournés du rein du rat, telle qu'elle a été observée par Goldberg et ses collaborateurs, même en utilisant leur propre technique. De plus, la constatation de ces auteurs que le 5-AMP n'active pas la phosphorylase nous paraît étrange, puisque nous avons toujours observé une activation de la "phosphorylase active" par l'AMP.

Takeuchi et Kuriaki (1955), pour la première fois, en se basant sur les données biochimiques, sont parvenus à résoudre le problème de l'activation. Les résultats obtenus par les différents auteurs paraissent satisfaisants dans leur ensemble. Mais cette technique n'ayant révélé aucune activité dans le foie, nous l'avons soumise à un examen critique. Aucune explication de cette anomalie n'était évidente. Même Takeuchi, dans une communication personnelle, a expliqué cette irrégularité par l'instabilité de cette enzyme. Bientôt nous avons remarqué que cette fluctuation était tributaire des études biochimiques réalisées avant 1955. C'est l'existence de la phosphorylase kinase révélée dans le foie par Sutherland et ses collaborateurs en 1956 et par Krebs et ses collaborateurs dans le muscle qui nous a conduit à mettre au point cette technique, basée sur l'activation de la phosphorylase kinase. En employant cette technique le problème de la mise en évidence de l'activité phosphorylasique au niveau du foie est définitivement résolu .

Takeuchi, Higasi et Watanuki (1955) ont pu tout de même démontrer une activité phosphorylasique dans le foie du lapin (irrégulièrement), du chien et de l'homme. Nos expériences ont démontré que la technique de Takeuchi et Kuriaki est capable de démontrer cette activité lorsque la forme active est présente dans le foie (la forme active révélée par la technique de la phosphorylase active préexistante). La technique de Takeuchi et Kuriaki révèle l'état actif (provoqué par l'AMP) de la phosphorylase active préexistante (cette forme est désignée arbitrairement comme forme a' dans le texte).

D'ailleurs nous ne sommes pas d'accord avec Takeuchi, Higasi et Watanuki (1955) sur le fait que l'activité phosphorylasique est révélée seulement par la coloration bleue ou bleu-violet à l'iode et le polysaccharide préexistant par une coloration brune. En effet, nous n'avons pu trouver une coloration quelconque du polysaccharide préexistant par le lugol à la concentration emplcyée pour la révélation du polysaccharide néoformé. Contrairement à cette constatation, nous avons trouvé que la coloration du polysaccharide néoformé dans le foie varie entre le rouge-brun et le brun-pourpre et dans le muscle cette coloration varie entre bleu et bleu-violet tandis que dans le cerveau plusieurs teintes se produisent, variant du rouge-brun au violet foncé. Shimizu et Okada (1957) ont observé une variation pareille au niveau du cerveau.

Friede (1959) a recherché l'activité de la phosphorylase au niveau du cerveau en employant son propre milieu d'incubation. Dans ce milieu d'incubation il a ajouté l'acide monoiodoacétique (0,25 p. 100) afin de bloquer l'action de la phosphoglucomutase. Mais la phosphorylase elle-même, qui a besoin du groupe -SH pour son action (Madsen et Cori 1956), est inhibée par l'acide monoiodoacétique. Ce genre d'inhibition, par l'acétylation du groupe -SH est irréversible. Nos expériences ont nettement démontré que la phosphorylase du cerveau et d'autres organes est totalement inhibée pour une concentration en acide monoiodacétique (0,02 M) inférieure à celle employée par cet auteur.

Parmi les autres techniques proposées on peut citer celles de Grillo (1960). Selon cet auteur la phosphorylase dans le foie peut être démontrée soit par l'addition du cyclo 3',5'-AMP soit par l'addition de l'adrénaline ou du glucagon dans le milieu d'incubation. L'activation de la phosphorylase inactive du foie par le cyclique 3',5'-AMP a été démontré par nous aussi (page 107). Mais nous avons remarqué, conformément aux données biochimiques, que la présence d'ATP et de magnésium dans le milieu d'incubation est absolument nécessaire pour une activation par l'adrénaline et par le glucagon (Fig 74). La figure 73 démontre l'absence d'activation par l'adrénaline en absence d'ATP et Mg^{++}

Godlewski (1960a) a proposé une technique pour la mise en évidence de la phosphorylase dans le foie et dans l'utérus. Selon cet auteur, l'absence de l'activité de la phosphorylase dans ces organes est probablement due au changement spontané de la phosphorylase b en phosphorylase a (forme active). La forme active ne peut être démontrée par les procédés histochimiques.

"Afin de bloquer cette conversion spontanée on a décidé de chélater les ions magnésium tissulaire à l'aide de l'EDTA. L'EDTA ajouté au substrat à la concentration finale 0,001 M augmente l'intensité de réaction des phosphorylases".(Godlewski 1960a)

La critique de cette interprétation est évidente. De premier abord, nous avons déjà démontré que la forme active de la phosphorylase, peut être facilement démontrée en l'absence d'AMP, lorsqu'elle est présente dans les coupes. Nous avons également démontré que la forme inactive n'est pas transformée en forme active spontanément. L'intensité de la réaction pour la phosphorylase active est identique tant en présence qu'en absence de l'EDTA.

Deuxièmement cet auteur n'a pas rendu compte du fait que la phosphorylase inactive du foie n'est pas activée par l'AMP. Le seul moyen de la démontrer est de transformer en forme active par l'activation de la phosphorylase kinase. Ces faits indiquent nettement que la théorie de Godlewski (1960) selon laquelle uniquement la phosphorylase inactive peut être démontrée par les méthodes histochimiques n'est pas valable devant les faits biochimiques et histochimiques.

CONCLUSION

Au cours de nos recherches histoenzymologiques de la glycolyse anaérobique nous avons remarqué que la technique classique de Takeuchi et Kuriaki (1955) était incapable de déceler l'activité phosphorylasique au niveau du foie. Ceci nous a paru étonnant vu l'intensité de la synthèse enzymatique et la richesse en glycogène dans cet organe.

Nous avons alors repris le problème sous l'angle biochimique et l'avons transposé aux données histochimiques. Il fallait tenir compte de l'existence de deux formes de la phosphorylase, l'une active (forme a), et l'autre inactive (forme b). La technique de Takeuchi et Kuriaki, employée jusqu'à ce jour par les différents auteurs, utilise l'acide adénylique ou AMP comme activateur de la phosphorylase inactive. Nos recherches sur l'activation de la phosphorylase du foie nous ont démontré que l'acide adénylique (AMP) ne réagissait nullement comme activateur de la phosphorylase inactive du foie. Nos observations se sont vues confirmées par des travaux biochimiques récents de Sutherland et ses collaborateurs (1956).

La découverte de l'enzyme de transformation de la phosphorylase inactive en forme active, appelée encore "phosphorylase-kinase", a été effectuée dans le muscle par Krebs et ses collaborateurs (1955), et dans le foie par Sutherland et ses collaborateurs (1956). Nous avons adapté ces données biochimiques à nos études histochimiques, ce qui nous a permis de mettre au point une technique pour la mise en évidence de la phosphorylase.

Le principe de cette réaction histochimique consiste en une activation de la phosphorylase-kinase sous l'effet de l'ATP (acide adénosine triphosphate) et d'ions magnésium, et en une ihhibition simultanée de l'enzyme inactivateur de la phosphorylase.

En employant cette technique l'activité phosphorylasique a pu être décelée dans le foie de toutes les espèces étudiées. De plus, cette technique a révélé l'existence de la phosphorylase-kinase non seulement dans le foie et dans le muscle, mais aussi dans d'autres organes tels que l'utérus, le cerveau, le cartilage, la peau, le rein et la cornée.

Nous avons recherché la distribution de la phosphorylase dans les tissus des animaux de laboratoire et dans quelques tissus humains (matériel de biopsie). Nous avons alors confronté les résultats antérieurs obtenus par la technique de Takeuchi et Kuriaki, et ceux obtenus par notre technique.

Nos études ont porté également sur le mécanisme d'activation de la phosphorylase dans les conditions physiologiques. Nos conditions expérimentales nous font admettre que la technique proposée par nous est très proche des conditions physiologiques observées dans les tissus. Nous avons montré la nécessité du fluorure de sodium, de l'ATP et d'ions de magnésium dans le milieu d'incubation. Nous avons étudié, de plus, le rôle du glycogène endogène et avons démontré l'importance de l'effet de la température et du pH dans cette activité.

Puisque le problème de la fixation intéresse énormément les histoenzymologistes, nous l'avons abordé également. L'effet de différents fixateurs d'enzymes a été étudié sur les tissus en bloc et sur les coupes fraîches. Aucun fixateur n'est capable de conserver l'activité phosphorylasique quand le tissu est fixé en bloc. Par contre, dans les coupes fraîches, l'acétone et l'alcool conservent une activité considérable pour la plupart des tissus. Toutes les variantes du formol employées comme fixateurs des enzymes détruisent cette enzyme.

L'activation de la phosphorylase active par l'AMP a été étudiée, de même que l'activation par la protamine des différentes formes de la phosphorylase, en présence et en l'absence de l'AMP.

L'effet de l'insuline et de l'héparine sur l'activité phosphorylasique ont également fait l'objet de nos études.

Toutes nos recherches . montrent donc que la réaction observée est spécifique à la phosphorylase. Nous avons avancé les preuves de l'activation spécifique de la phosphorylase-kinase par notre réaction.

Les expériences destinées à démontrer l'effet des agents réducteurs ont fait l'objet d'une série d'essais importants. Les causes des différences histochimiques avec les résultats obtenus par les études biochimiques ont été clairement établies.

L'inhibition de la phosphorylase par le chloromercuribenzoate (PCMB) n'a pu être prouvée dans les conditions histochimiques. Si la participation du groupe -SH à l'action de la phosphorylase n'a pu être prouvée par l'étude de l'effet du PCMB, cette preuve a néanmoins pu être apportée grâce à l'étude de l'inhibition par le monoiodacétate.

Ces dernières recherches ont montré que les données bicchimiques ne sont pas tout à fait transposables aux études histochimiques. Les divergences des résultats sont très souvent dues aux conditions différentes de nos études de celles des biochimistes. Des résultats biochimiques apparemment en contradiction avec les résultats histochimiques peuvent facilement induire les histochimistes en erreur. Mais, d'un autre côté, l'histochimiste peut compléter ou prolonger les données fournies par les biochimistes. Pour cette raison, les conditions biochimiques dans lesquelles les résultats ont obtenus doivent être examinées d'une manière critique.

Nous avons prolongé ces recherches par des études expérimentales. Nous avons soumis des rats à l'anoxie, et des rattes aux infrasons et obtenu des résultats intéressants. La glycogénolyse était accélérée chez les premiers et l'activité enzymatique restait inchangée chez les secondss.

L'administration du glucagon à des doses différentes chez le lapin provoque une glycogénolyse. Cette glycogénolyse est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la phosphorylase active. Ces observations confirment les résultats obtenus par les biochimistes.

Le rôle et le problème de la mise en évidence de l'enzyme branchante (ou la branching Enzyme) qui réagit concuremment avec la phosphorylase pour la synthèse du glycogène a fait l'objet d'une part non négligeable de nos recherches.

Après avoir étudié , à la lumière des données biochimiques, lés divers aspects histochimiques de l'activité phosphorylasique, nous avons soumis les techniques antérieures à l'examen critique.

BIBLIOGRAPHIE

BAKER J.R., HEW H. et FEHMANN W.H.

The use of chloralhydrate formaldehyde fixative solution in enzyme histochemistry.
J. Histochem. Cytochem., 1958, 6 : 244-250.

BALDWIN E.J.

Dynamic aspects of Biochemistry, 2e édit.
Edit. Cambridge University Press, 1957.

BARANOWSKI T., ILLINGWORTH B., BROWN D.H. et CORI C.F.

The isolation of pyridoxal-5-phosphate from crystalline muscle phosphorylase.
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25 : 16-21.

BELFORD J. et FEINLEIB M.R.

Phosphorylase activity of heart muscle under various conditions affecting force of contraction.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1959, 127 : 257-264

BELOFF-CHAIN A., CANTANZARO R., CHAIN E.B., MASI I. et PECCHIARI F.

The influence of insuline on carbohydrate metabolism in the isolated rat disphragm muscle of normal and alloxan diabetic rat.
Proc. Roy. Soc. Lond. B., 1955, 143 : 481-503.

BERNFELD P.

Enzymes of starch degradation and synthesis.
Adv. Enzymol., 1951, 12 : 379-428.

BERTHET J., SUTHERLAND E.J. et MAKMAN M.H.

Observations on the action of certain sulfonylurea derivates.
Metabolism, 1956, 5 : 768-773.

BERTHET J., JACQUES P., HERS H.G. et DE DUVE C.

Influence de l'insuline et du glucagon sur la synthèse du glycogène hépatique.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20 : 190-200.

BERTHET J.

Some Aspects of the glucagon metabolism
Amer. J. Med., 1959, 26 : 703-714.

BLOOM W.L., LEWIS G.T., SCHUMPERT M.Z. et SHEN T.

Glycogen fraction of liver and muscle
J. Biol. Chem., 1951, 188 : 631-641.

BO W.J.

Distribution of phosphorylase in the uteri of cyclic and hormone treated rats.
J. Histochem. and Cytochem., 1959, 7 : 403-408.

BO W.J.

The effect of hormone treatment on the phosphorylase activity of the rabbit uterus.
J. Histochem. Cytochem., 1961, 9 : 430-433.

BOSE B.C., VIJAYVARGIYA R. et SHARMA S.

In vitro studies of the role of butylsulfonylurea (tolbutamide) on the rat liver phosphorylase and phosphatase activity.
Ind. J. Med. Sci., 1958, 12 : 995-998.

BRAUN-FALCO O.

Phosphorylase activity in human skin (letter to the editor).
J. Histochem. Cytochem., 1956, 4 : 300.

BRAUN-FALCO O.

Über die Fähigkeit der menschlichen Haut zur Polysaccharidsynthese ein Beitrag zur Histotopochimie der Phosphorylase.
Arch. Klin. Exp. Derm., 1956b, 202 : 163-170.

BRAUN-FALCO O.

Zur Histotopographie der Phosphorylase bei Basaliom und Psoriasis
Arch. Klin. Exp. Derm. 1957, 204 : 175-181.

BRODY S.

Hormonal influence on the phosphorylase activity of the human myometriu
Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27 : 318-323.

BROWN D.H., ILLINGWORTH B. et CORI C.F.

The mechanism of de novo synthesis of polysaccharide by phosphorylase.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1961, 47 : 479-485.

BURSTONE M.S.

The relationship between fixation and techniques for the localization of hydrolytic enzymes.
J. Histochem. Cytochem., 1958, 6 : 322-339.

CAHILL G.F. et EARLE A.S.

In vivo effects of glucagon on hepatic glycogen and glycogenolytic enzymes.
J. Clin. Endocrinol. 1956, 16 : 935.

CAHILL G.F., ASHMORE J., ZOTTU S. et HASTINGS A.B.

Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices.
IX. Ionic and hormonal effects of phosphorylase and glycogen.
J. Biol. Chem., 1957a, 224 : 237-250.

CAHILL G.F., ZOTTU S. et EARLE A.S.

In vivo effects of glucagon, on hepatic glycogen, phosphorylase and glucose-6-phosphatase.
Endocrinology, 1957b, 60 : 265-269.

CARLSON A.S. et HEHRE E.J.

Composition of the starch synthetised from glucose-1-phosphate by diphteria bacilli.
J. Biol. Chem., 1949, 177 : 281-288.

CAVIER R. et SAVEL J.

Sur la précence d'une phosphorylase chez l'ascaris du porc, Ascaris lumbricoides Linné 1758.
C.R. Acad. Sci., 1953, 237 : 99-101.

COBB J.G.

Relation of glycogen, phosphorylase, and ground substance to calcification of bone.
Arch. Path., 1953, 55 : 496-502.

COHN M. et CORI G.T.

On the mechanism of action of muscle and potatoe phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1948, 175 : 89-94.

COLOMBO J.P., WEBER J.W., GIUDOTTI G., KANMEISHI D. et FOA P.F.

Liver phosphorylase in normal and adrenalectomized dogs treated with serotonin.
Endocrinology, 1960, 67 : 693-697.

COOK W.H., LIPKIN D. et MARKHAM R.

The formation of a cyclic dianhydroadenylic acid by the alkaline degradation of adenosine-5-phosphoric acid.
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79 : 3607-3608.

CORI C.F.

Mammalian carbohydrate metabolism.
Physiol. Rev. 1931, 11 : 143-275.

CORI C.F. et CORI G.T.

Mechanism of formation of hexose monophosphate in muscle and isolation of new phosphate ester.
Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 1936, 34 : 702-705.

CORI C.F. Et CORI G.T.

Formation of glucose-1-phosphoric acid in muscle extract.
Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 1937, 36 : 119-122.

CORI C.F.

Glycogen breakdown and synthesis in animal tissues.
Endocrinology, 1940, 26 : 285-296.

CORI C.F., CORI G.T. et GREEN A.A.

Crystalline muscle phosphorylase. III. Kinetics.
J. Biol. Chem., 1943, 151 : 39-55.

CORI C.F. et CORI G.T.

The activity and crystallization of phosphorylase b.
J. Biol. Chem., 1945, 158 : 341-345.

CORI C.F. et ILLINGWORTH B.

The effect of epinephrine and other glycogenolytic agents on the phosphorylase a content of the muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21 : 105-107.

CORI C.F.

Regulation of enzyme activity in muscle during work.
Enzyme Units of biological structure and function.
Acad. Press Edit., N.Y. 1956, 573-578.

CORI C.F. et ILLINGWORTH B.

The prosthetique group of phosphorylase.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1957, 43 : 547-553.

CORI G.T., COLOWICK S.P. et CORI C.F.

The formation of glucose-1-phosphoric acid in extracts of mammalian tissues and of yeast.
J. Biol. Chem., 1938, 123 : 375-380.

CORI G.T. et CORI C.F.

The activating effects of/glycogen on the enzymatic synthesis of the glycogen from glucose-1-phosphate (Letter to the editor).
J. Biol. Chem., 1939, 131 : 397.

CORI G.T. et CORI C.F.

The kinetics of the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate.
J. Biol. Chem., 1940, 135 : 733-756.

CORI G.T. et GREEN A.A.

Crystalline muscle phosphorylase. II. Prosthetic group.
J. Biol. Chem., 1943, 151 : 31-38.

CORI G.T. et CORI C.F.

Crystalline muscle phosphorylase. IV. Formation of glycogen.
J. Biol. Chem., 1943, 151 : 57-63.

CORI G.T. et CORI C.F.

The enzymatic conversion of phosphorylase a to b.
J. Biol. Chem., 1945, 158 : 321-332.

CORI G.T.

The effect of stimulation and recovery on the phosphorylase a content of muscle.
J. Biol. Chem., 1945, 158 : 333-339.

CORI G.T. et LARNER J.

Action of amylo-1,6-glucosidase and phosphorylase on glycogen and amylopectin.
J. Biol. Chem., 1951, 188 : 17-29.

CORI G.T. et CORI C.F.

Glucose-6-phosphatese of the liver in glycogen storage disease.
J. Biol. Chem., 1952, 199 : 661-667.

CORI G.T.

Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease.
Harvey Lecture, 1954, 48 : 145-171.

CORI G.T. et ILLINGWORTH B.

The effect of epinephrine and other glycogenolytic agents on the phosphorylase a content of the muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21 : 105-108.

CORNBLATH M.

Reactivation of liver phosphorylase by epinephrine, glucagon and ephedrine.
Am. J. Physiol., 1955, 183 : 240-244.

COWGILL R.W. et CORI C.F.

The conversion of inactive phosphorylase to phosphorylase b and phosphorylase a in lobster muscle extract.
J. Biol. Chem., 1955, 216 : 133-140.

COWGILL R.W.

Lobster muscle phosphorylase ; purification and properties.
J. Biol. Chem., 1959 a, 234 : 3146-3153.

COWGILL R.W.

The conversion of lobster muscle phosphorylase a to b and phosphorylase b to a.
J. Biol. Chem., 1959 b, 234 : 3154-3157.

CREASEY N.H. et GRAY C.R.

Enzymes concerned in the synthesis of glycogen from glucose in the brown adipose tissue.
Biochem. J., 1951-1952, 50 : 74-81.

DEANE H.W., NESBETT F.B., BUCHANON S. et HASTINGS A.B.

A cytochemical study of glycogen synthetized from glucose or pyruvate by liver slices in vitro.
J. Cell. and Comp. Physiol., 1947, 30 : 255-269.

DE DUVE C. et BERTHET J.

Le glucagon; rapport de la IV° réunion des endocrinologistes de langue française.
Colloque d'Endocrinologie, 1957, 333-397.

DE SOUSA C.S.

Glucogenio hépatico e atividade enzymatica no figado dos distroficos.
J. Pediat., Rio., 1958, 23 : 527-539.

DUBOWITZ V. et PEARSE A.G.E.

Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle.
Nature, 1960a, 185 : 701-702.

DUBOWITZ V. et PEARSE A.G.E.

Oxidative enzymes and phosphorylase in central core disease of muscle
Lancet, 1960 b, 2 : 23-23.

ELLIS R.A. et MONTAGNA W.

Histology and cytochemistry of human skin. XV. Sites of phosphorylase and amylo-1,6-glucosidase activity.
J. Histochem. Cytochem., 1958, 6 : 201-207.

ELLIS R.A. et MONTAGNA W.

Comparative histochemistry of the sweatglands of primates (Abstract, Proc. Histochem. Soc. U.S.A. 1959).
J. Histochem. Cytochem. 1959, 7 : 308.

EMBERLAND R.

Adrenal phosphorylase and action of corticoprophin.
Acta Endocrinol., 1960, 34 : 69-76.

FANGER H. et BARKER B.E.

Phosphorylase and amylo-1,6-glucosidase in breast tissues.
J. Nat. Cancer Inst., 1960, 24 : 691-697.

FISCHER E.H. et KREBS E.G.

Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts.
J. Biol. Chem., 1955, 216 : 121-132.

FISCHER E. H., GRAVES D. J., CRITENDEN E. R. S. et KREBS E. G.

Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase b to a reaction
J. Biol. Chem., 1959, 234 : 1698-1804.

FREDRICK J. F.

Chromatographic patterns of polysaccharide-synthetizing enzymes of cyanophycae.
Phyton, Argentina, , 1959, 13 : 15-20.

FRIEDE R.

Eine histochimische Reaktion zum Nachweiss von Phosphorylase mit besonderer Berücksichtingung des Nervensystems.
Arch. Psychiatr. u. Zts. Neurol., 1956, 195 : 325-336.

FRIEDE R. L.

Histochemical demonstration of phosphorylase in brain tissue ; association of postmortal Neuron changes with phosphorylase activity.
J. Histochem. Cytochem., 1959, 7 : 34-38.

GAUTHERON D. et CLAUSER H.

Inhibition de la glycolyse anaérobie de l'utérus de rat par l'adrénaline et l'hormone de croissance.
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24 : 385-388.

GIUSI G.

Attivita fosforilasica delle emazie.
Bull. Soc. ital. Biol. sperm., 1958, 34 : 733-734.

GODLEWSKI H. G.

L'application de l'acide de l'ethylènediamine tétraacétique (EDTA) à l'étude histochimique des phosphorylases et des "branching enzyme" (résumé)
1er Congrès International d'Histochimie et de Cytochimie, Paris 1960a, p. 77.

GODLEWSKI H. G.

Application of ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) in the histochemical method for demonstration of phosphorylase and branching enzyme.
Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol), 1960b, 8 : 441-444.

GODLEWSKI H. G.

The histochemically demonstrable phosphorylase and branching enzyme activity in some animal's ascites tumor cells.
Acta Histochem., 1961a, 11 : 58-67.

GODLEWSKI H.G. et SKURZAK H.

Phosphorylase and branchig enzyme in the vagina, uterus and liver of castrated rats treated with estrogens : A histochemical approach.
Folia Biologica, 1961 b, 9 : 101-110.

GODLEWSKI H.G. et PENAR B.

Histochemical investigations of phosphorylase and glycogen in liver of normal and tumor bearing rodents.
Bull. Acad. Pol. Sci., 1961 c, 9 : 195-199.

GOLDBERG O.B., WADE C. et JONES H.W.

Polysaccharide synthesis in frozen tissue sections as a histochemical method for phosphorylase.
J. Nat. Cancer Inst., 1952-53, 13 : 543-557.

GOLTZ R.W., FUSARO R.M., BLAZEJOVSKY R. et JARVIS J.

Pathways of carbohydrate metabolism in normal and neoplastic cutaneous ectoderm : A histochemical study.
J. Invest. Dermatol., 1959, 33 : 337-345.

GORANSON E.S., DANOFF N.M. et PURDIE E.F.

The effect of inanition on muscle phosphorylase and hexokinase in the rat.
Federation Proc., 1950, 9: 49.

GORANSON E.S., McBRIDE J. et WEBER G.

Phosphorylase activity in rat hepatoma and mouse carcinoma transplant.
Cancer Research, 1954, 14 : 227-231.

GOULD M.K. et RAWLISON W.A.

Biochemical adaptation as a response to exercise. Effect of swimming on the levels of lactic dehydrogenase, malic dehydrogenase and phosphorylase in muscles of 8-, 11- and 15-week old rats.
Biochem., J., 1959, 73 : 41-44.

GREEN A.A. et GORI G.T.

Crystalline muscle phosphorylase. I. Preparation, properties and molecular weight.
J. Biol. Chem ., 1943, 151 : 21-29.

GREEN A.A.

The diffusion constant and electrophoretic mobility of phosphorylase a and b.
J. Biol. Chem., 1945, 158 : 315-319.

GRILLO T.A.I.

Histochemical demonstration of liver phosphorylase (résumé; 11e réunion annuelle, Histochemical Society, U.S.A.)
J. Histochem. Cytochem., 1960, 8 : 322.

GRILLO T.A.I.

Histochemical study of phosphorylase in tissues of the chick-embryo.
J. Histochem. Cytochem., 1961, 9 : 386-391.

GROGNOT P., SENELAR R. et LOUBIERE R.

Action des vibrations aériennes infrasonores sur le poumon durat.
Acustica, 1959, 9 : 173-175.

GUHA S. et WEGMANN R.

Etudes sur l'activité phosphorylasique. I. Une nouvelle méthode de mise en évidence de la phosphorylase.
Ann. Histochim., 1959, 4 : 103-114.

GUHA S. et WEGMANN R.

Etudes sur l'activité phosphorylasique. IV. Activation in vitro par la protamine.
Ann. Histochim., 1960a, 5 : 1-8.

GUHA S. et WEGMANN R.

La mise en évidence histochimique de l'activité phosphorylasique dans le foie et dans d'autres organes.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1960b, 42 : 115-121.

GUHA S. et WEGMANN R.

Etudes histochimiques de l'activité phosphorylasique. Mise en évidence par l'activation de la phosphorylase-kinase (résumé).
1er Congrès International d'Histochimie et de Cytochimie, 1960c, p. 73.

GUHA S. et WEGMANN R.

Phosphorylase in chick-embryo liver (letters to the Editor).
J. Histochem. Cytochem., 1961, 9 : 454-455.

HADJIOLOV A.A. et DANCHEVA K.I.

Phosphorylase activity of primary rat liver cancer.
Nature, 1958, 181 : 547-548.

HADJIOLOV A.A. et DANCHEVA K.I.

Etudes sur le rôle des 5'-ribonucleotides comme cofacteur de la phosphorylase hépatique.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41 : 707-714.

HAMURO Y.

Histochemical studies on glycogen and certain enzymes in the recovery of the brain injuries. II. Phosphatases, succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, 5-nucleotidase and phosphorylase.
Arch. Hist. Jap., 1957, 13 : 69-100.

HANES C.S.

The breakdown and synthesis of starch by an enzyme system from pea seeds.
Proc. Roy. Soc. Lond. B, 1940a, 128 : 421-450.

HANES C.S.

The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalyzed by potatoe phosphorylase.
Proc. Roy. Soc. Lond. B, 1940b, 129 : 174-208.

HASSID W.Z., DOUDOROFF M. et BARKER H.A.

Phosphorylase-Phosphorolysis and synthesis of saccharides.
The Enzymes, v. I pt.II, 1951, 1014-1039.
(Edit. Academic Press, New-York)

HASTINGS A.B., ASHMORE J. et CAHILL G.F.

Intracellular environment and enzyme activities; carbohydrate metabolism in liver.
Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65 : 78-85.

HAUGAARD N., KUKEVETZ W.R. et HESS M.E.

Discussion : The effect of sympathomimetic amines on phosphorylase activity of the rat heart.
Pharmacol. Rev., 1959, 11 : 466-468.

HAUK R., ILLINGWORTH B., BROWN D.H. et CORI C.F.

Enzymes of glycogen synthesis in glycogen deposition disease.
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33 : 554-556.

HAUK R. et BROWN D.H.

Preparation and properties of uridine diphosphoglucose-glycogen transferase from rabbit muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33 : 556-559.

HAWORTH W.N., PEAT S. et BOURNE E.J.

Synthesis of amylopectin
Nature, 1944, 154 : 236-238.

HAYNES R.C. et BERTHET L.

Studies on the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone.
J. Biol. Chem., 1957, 225 : 115-124.

HAYNES R.C.

The action on adrenal phosphorylase by the adrenocorticotrophic hormone.
J. Biol. Chem., 1958, 233 : 1220-1222.

HAYNES R.C., SUTHERLAND E.W., et RALL T.W.

The role of cyclic adenylic acid in hormone action.
Rec. Prog. Hormone Res., 1960, 16 ; 121-138.

HEBERT S., GUHA S. et WEGMANN R.

Mise en évidence d'une activité phosphorylasique dans les cultures de tissus.
Ann. Histochim., 1960, 5 : 143-146.

HEHRE E.J.

Synthesis of a polysaccharide of the starch glycogen class from sucrose by a cell free bacterial enzyme system.
J. Biol. Chem., 1949, 177 : 267-279.

HELVE O.E.

Effect of adrenalectomy on the phosphorylation in muscle.
Acta Physiol. Scandinav., 1944, 7 : 108-114.

HENION W.F. et SUTHERLAND E.W.

Immunological differences of phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1957, 224 : 477-488.

HERBENER G. et ATKINSON W.B.

Amount and distribution of amylophosphorylase in uterus of rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1959, 100 : 736-737.

HESS W.C., SHAFFRAN I.P. et EVERITT E.L.

Effett of cortisone on liver phosphorylase activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 103 : 695-699.

HESTRIN S.

Action pattern of crystalline muscle phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1949, 179 : 943-956.

ILLINGWORTH B., LARNER J. et CORI G.T.

Structure of glycogen and amylopectin. I. Enzymatic determination of chain length.
J. Biol. Chem., 1952, 199 : 631-640.

ILLINGWORTH B. et CORI G.T.

Structure of glycogen and amylopectin. III. Normal and abnormal human glycogen.
J. Biol. Chem., 1952, 199 : 653-659.

ILLINGWORTH B., CORI G.T. et CORI C.F.

Amylo-1,6-glucosidase in muscle tissues in generalized glycogen storage disease.
J. Biol. Chem., 1956, 218 : 123-129.

ILLINGWORTH B., HENDRIK S.J., BROWN D.H. et CORI C.F.

Observations of the function of pyridoxal-5-phosphate in phosphorylase.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 1958, 44 : 1180-1191.

ILLINGWORTH B., BROWN D.H. et CORI C.F.

The de novo synthesis of polysaccharide by phosphorylase.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1961, 47 : 469-478.

JEUNE M., FRANÇOIS R. et JARLOT B.

Contribution à l'étude des polycories glycogéniques du foie.
Rev. Inter. Hépatologie, 1959, 9 : 1-34.

JOKAY I., BÓT G. et SZILAGYI T.

The antigenic properties of muscle phosphorylase (en hongrois ; résumé de "Chemical Abstract").
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1958, 14 : 155-161.

KELLER P.J. et CORI G.T.

Enzymatic conversion of phosphorylase a to phosphorylase b.
Biochim. Biophys. Acta. 1953, 12 : 235-238.

KELLER P.J. et CORI C.T.

Purification and properties of the Phosphorylase-Rupturing enzyme.
J. Biol. Chem. 1955, 214 : 127-134.

KELLER P.J.

The action of trypsin on phosphorylase a.
J. Biol. Chim., 1955, 214 : 135-141.

KELLER P.J. et FRIED M.

Inhibition of the Phosphorylase-Rupturing enzyme by some trypsin substrates.
J. Biol. Chem., 1955, 214 : 143-148.

KENT A.B., KREBS E.G. et FISCHER E.H.

Properties of crystalline phosphorylase b.
J. Biol. Chem., 1958, 232 : 549-558.

KERPPOLA W.

Inhibition of phosphorylase with cortisone and its activation with adrenaline in the rabbit.
Endocrinology, 1952, 51 : 192-202.

KIBLER R.F., TAYLOR W.J. et MYERS J.D.

Effects in the man of the hyperglycemic glycogenolytic factor of the pancreas.
Am. J. Med., 1952, 13 : 647-652.

KIESSELING W.

Über den das Glykogen phosphorienden Ferment- Protein- Komplex und eine enzymatische reversible Glykogensynthese.
Biochem. Z., 1939, 302 : 50-72.

KIHLMAN B. et OVERGAARD-HANSEN K.

Inhibition of muscle phosphorylase by methylated oxypurines.
Exp. Cell Res., 1955, 8 : 252-255.

KOBAYAKAWA S.

Histochemical and biochemical study on the distribution of amylophosphorylase in human embryos (en japonais ; résumé en anglais).
Igaku Kenkyu, 1957, 27 : 1659-1688.

KOCSAR L., VERESS C. et KAJTOR F.

Effect of andaxin (meprobamate) on the phosphorylase activity of skeletal musculature (en hongrois ; résumé en anglais).
Ideggyogy Szemele, 1960, 13 : 90-93.

KREBS E.G.

The effect of salmine on the activity of phosphorylase.
Biochim. Biophys. Acta. 1954, 15 : 508-515.

KREBS E.G. et FISCHER E.H.

Phosphorylase activity of skeletal muscle extracts.
J. Biol. Chem., 1955, 216 : 113-120.

KREBS E.G. et FISCHER E.H.

The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20 : 150-157.

KREBS E.G., KENT A.B., GRAVES D.J. et FISCHER E.H.

The activation and inactivation of muscle phosphorylase
Proc. International Symposium of Enzyme Chemistry, Tokyo et Kyoto, 1957, p. 41-43.

KREBS E.G., KENT A.B. et FISCHER E.H.

The muscle phosphorylase-b-kinase reaction.
J. Biol. Chem., 1958, 231 : 73-83.

KREBS E.G., GRAVES D.J. et FISCHER E.H.

Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase.
J. Biol. Chem., 1959, 234 : 2867-2873.

KUGLER J.H. et WILKINSON W.J.C.

A relation between total glycogen content of ox myocardium and its histochemical demonstration.
J. Histochem. Cytochem., 1959, 7 : 398-402.

KUGLER J.H. et WILKINSON W.J.C.

Glycogen fractions and their role in the histochemical detection of glycogen
J. Histochem. Cytochem., 1960, 8 : 195-199.

KUKOVETZ W.R., HESS M.E., SHANFELD J. et HAUGAARD N.

The action of sympathomimetic amines on isometric contraction and phosphorylase activity of the isolated rat heart.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1959, 127 : 122-127.

LACROIX E. et LEUSEN I.

Influence of sympathomimetic amines in phosphorylase activity of isolated perfused heart.
Arch. Int. Pharmacodyn., 1960, 126 : 482-485.

LAMY M., DUBOIS R., ROSSIER A., FRÉZAL J., LOEB H. et BLANCHAR G.

La glycogénose par déficience en phosphorylase hépatique.
Arch. Franç. Pediatr., 1960, 17 : 1-24.

LARNER J., ILLINGWORTH B., CORI G.T. et CORI C.F.

Structure of glycogen and amylopectin. II. Analysis by stepwise enzymatic degradation.
J. Biol. Chem., 1952, 199 : 641-652.

LARNER J.

The action of branching enzyme on outer chain of glycogen.
J. Biol. Chem., 1953, 202 : 491-503.

LARNER J.

The action of crystalline muscle phosphorylase on outer chains of glycogen and amylopectin.
J. Biol. Chem., 1955, 212 : 9-18.

LARNER J. et SCHLISELFELD L.H.

Studies on amylo-1,6-glucosidase.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20 : 53-61.

LARNER J., VILLAR-PALASI C. et RICHMAN J.

Insulin stimulated glycogen formation in rat diaphragm.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 82 : 345-353.

LARNER J. et VILAR-PALASI C.

The cori ester and uridine diphosphate glucose (UDPG) in glycogen synthesis and degradation.
1er Symposium International sur l'Ester de Cori, Italie, 1960.

LELOIR L.F. et CARDINI C.E.

Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose.
J. Am. Chem. Soc., 1957, 79 : 6340-6341.

LELOIR L.F., CLAVARRIA J.M., GOLDEMBERG S.H. et CARMINATTI H.

Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose.
Arch. Biochem. Biophys. 1959, 81 : 508-520.

LELOIR L.F. et GOLDEMBERG S.H.

Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver.
J. Biol. Chem., 1960, 235 : 919-923.

LEONARD S.L.

The effect of hormones on phosphorylase activity in skeletal muscle.
Endocrinology, 1957, 60 : 619-624.

LEONARD S.L.

Hormonal effects of phosphorylase activity in the rat uterus.
Endocrinology, 1958, 63 : 853-859.

LEONARD S.L. et WIMSATT W.A.

Phosphorylase and glycogen levels in skeletal muscles and liver of hibernating and non-hibernating bats.
Am. J. Physiol., 1959, 197 : 1059-1062.

LEONARD S.L. et DAY H.T.

Effect of hydroxytryptamine on phosphorylase and glycogen level in muscle tissue.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 104 : 338-341.

LOURAU M. et MEYER F.

Recherches sur le glycogène et le desmoglycogène du foie du rat. Incorporation du ^{14}C fourni par du glucose donné "par os"
J. Physiol., 1958, 50 : 5-17.

LOWER H.F.

Iodophil component of insect cuticle.
Stain Technol, 1957, 32 : 127-129.

LUNDBAEK K. et GORANSON E.S.

The effect of fasting on muscle phosphorylase activity in the rat.
Acta Physiol. Scandinav., 1949, 17 : 280-288.

MADSEN N.B. et CORI C.F.

The interaction of phosphorylase with protamine.
Biochim. Biophys. Acta, 1954, 15 : 516-525.

MADSEN N.B. et CORI C.F.

The interaction of muscle phosphorylase with parachloromercuribenzoate. I. Inhibition of activity and effect on molecular weight.
J. Biol. Chem., 1956, 223 : 1055-1065.

MADSEN N.B. et GURD F.R.M.

The interconversion of muscle phosphorylase with parachloromercuribenzoate. III. The reversible dissociation of phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1956, 223 : 1075-1087.

MADSEN N.B. et CORI C.F.

The binding of adenylic acid by muscle phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1957, 224 : 899-506.

MADSEN N.B. et CORI C.F.

The binding of glycogen and phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1958, 233 : 1251-1256.

MANNERS D.J.

The molecular structure of glycogen.
Adv. Carbohydrate Chem., 1957, 12 : 261-298.

MANSOUR T.E.

Discussion ; Action of serotonin and epinephrine on intact and broken cell preparation from the liver fluke, Fasciola hepatica.
Pharmacol. Rev., 1959, 11 : 465-466.

MANSOUR T.E. SUTHERLAND E.W., RALL T.W. et BUEDING E.

The effect of serotonin (5'-hydroxytryptamine) on the formation of adenosine-3',5'-phosphate by tissue particles from the liver fluke, Fasciola hepatica.
J. Biol. Chem., 1960, 235 : 466-470.

MATSUI T. et KURIAKI K.

Effect of denervation and cocainization on activity of creatine synthetizing enzyme and phosphorylase in skeletal muscle.
Am. J. Physiol., 1959, 196 : 461-464.

MAYER S.E. et MCRAN N.C.

Relation between pharmacologic augmentation of cardiac contractile force and the activation of myocardial glycogen phosphorylase.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1960, 129 : 271-281.

McARDLE B.

Myopathy due to defect in muscle glycogen breakdown.
Clin. Sci., 1951, 10 : 13-35.

McPHERSON C.R. et PEARSE A.G.E.

Histochemical changes in the potassium-depleted kidney.
British Med. Bull., 1957, 13 : 19-20.

MERCK

Merck Index. VIe édit.
Merck & Co Inc. Rahway. N.J.U.S.A. 1952.

MEYER K.H.

The chemistry of glycogen.
Adv. Enzymol., 1943, 3 : 109-135.

MEYER K.H. et GIBBONS G.C.

The present status of starch chemistry.
Adv. Enzymol., 1951, 12 : 341-374.

MIRSKI A.

Metabolism in adipose tissues in vitro.
Biochem. J. 1942, 36 : 232-239.

MCMMAERTS W.F.H.M., ILLINGWORTH B., PEARSON C.M., GUILLORY R.J. et SERIYADARIAN K.

A functional disorder of muscle associated with the absence of phosphorylase.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1959, 45 : 791-797.

NAGAYA Y.

Histochemical studies of glycogen phosphorylase. I. Method - II. Distribution.
Acta Soc. Opth. Jap., 1954, 58 : 473-478.

NAJJAR V.S.

The isolation and properties of phosphoglucomutase.
J. Biol. Chem., 1948, 175 : 271-290.

NEILANDS J.B. et STUMPF P.K.

Outlines of Enzyme Chemistry.
Edit. John Wiley & Sons, 2e éd., 1958.

NEMETH A.M., INSULL W. et FLEXENER L.B.

Glycogenesis in the liver of fetal guinea-pig.
J. Biol. Chem., 1954, 208 : 765-772.

NIMNI M.E., CARMINATTI H. et DELLACHA J.M.

Effect of dietary composition on rat liver phosphorylase activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 99 : 690-691.

NIEMEYER H.

Metabolismo de los hidratos de carbono en el higado.
Edit. Universidad de Chile, Santiago, 1955.

NIEMEYER H., GONZALEZ C. et ROZZI R.

The influence of diet on liver phosphorylase. I. Effect of fasting and refeeding.
J. Biol. Chem., 1961, 236 : 610-613.

NIRENBERG M.W.

An enzymatic defect in ascitestumor cells.
Biochem. Biophys. Acta, 1958, 30 : 203-204.

NIERNBERG M.W.

A biochemical characteristic of ascitestumor cells .
J. Biol. Chem., 1959, 234 : 3088-3093.

PARNAS M.J.K. et MOCHNAKA I.

Le rôle de l'acide inosique dans la glycolyse musculaire.
C.R. Soc. Biol., 1936, 123 : 1173-1175.

PEARSE A.G.E.

Histochemistry, theoretical and applied. 2e édit.
Edit. J. & A. Churchill, Londres, 1960.

PEAT S.E.

The biological transformation of starch
Adv. Enzymol., 1951, 11 : 339-375.

PLANEL H., GUILHEM A. et DUPRE.A.

Etude histochimique des enzymes de la glycogéno-génèse (Amylophosphorylase et amylo 1,4-1,6 transglucosidase) au niveau de la glande surrénale.
Ann. Histochim., 1960, 5 : 287-304.

RALL T.W., SUTHERLAND E.W. et WOSILAIT W.D.

The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and extracts.
J. Biol. Chem., 1956, 218 : 483-495.

RALL T.W., WOSILAIT W.D. et SUTHERLAND E.W.

The interconversion of phosphorylase a to phosphorylase b from dog heart muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1956b, 20 : 69-76.

RALL T.W., SUTHERLAND E.W. et BERTHET J.

The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenate.
J. Biol. Chem., 1957, 224 : 463-474.

RALL T.W. et SUTHERLAND E.W.

Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles.
J. Biol. Chem., 1958, 232 : 1065-1076.

RALL T.W. et SUTHERLAND E.W.

Action of epinephrine and norepinephrine in broken cell preparation.
Pharmacol. Rev., 1959, 11 : 464-465.

REITER M. et NCE J.

Die Phosphorylase-Aktivität der Leber unter dem Einfluss von Hunger und bei vergiftung mit amanitin.
Biochem. Z., 1957, 328 : 454-457.

RIESSER O.

Esterification velocity of pulped muscle of normal and adrenalectomized rats.
Enzymologia, 1945, 11 : 323-333.

ROBBINS P.W., TRAUT R.R. et LIPMANN F.

Glycogen synthesis from glucose, glucose-6-phosphate and uridine diphosphate glucose in muscle preparations.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1959, 45 : 6-11.

ROHDEWALD H.

Über die Phosphorylase der Leukozyten.
Biochem. Z., 1952, 323 : 146-152.

ROSENBAUM R.M. et GOOLSBY C.M.

The histochemical demonstration of hormonally controlled intracellular glycogen in the endometrium of the rat.
J. Histochem. Cytochem., 1957, 5 : 33-46.

ROSSI E.

Le glucagon.
Triangle, 1959, 4 : 1-6.

SCHMIDT J.E. et LEONARD S.L.

The effect of relaxin on uterine phosphorylase of rat.
Endocrinology, 1960, 67 : 663-667.

SCHMID R., ROBBINS F.W. et TRAUT R.R.

Glycogen synthesis in muscle lacking phosphorylase.
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1959, 45 : 1236-1240.

SEGAL S. et BLAIR A.

Effect of salicylate on muscle phosphorylase.
Nature, 1959, 183 : 1609-1610.

SHAPIRO B. et WERTHEIMER E.

Phosphorolysis and synthesis of glycogen in animal tissues.
Biochem. J., 1943, 37: 397-403.

SHIMIZU N. et OKADA M.

Histochemical distribution of phosphorylase in rodent brain from newborn to adult.
J. Biol. Chem., 1957, 5 : 459-471.

SMITH E.M.

The specificity of certain peptidases.
Adv. Enzymol., 1951, 12 : 238-240.

STÄHLEIN D. et VÖGTLI W.

Glykogen-Phosphorylierung bei adrenalektomierten Katzen und Ratten durch Muskel und Leber.
Helv. Physiol. Acta, 1948, 6 : 317-330.

STETTEN D. (Jr) et STETTEN M.R.

"Homopolysaccharides" in Third Conference on Polysaccharides in Biology (Edit. G.F. Springer).
Josiah Macy Found., 1957, 9-148.

STETTEN D.(Jr) et STETTEN M.
Glycogen metabolism.
Physiol. Rev., 1960, 40 : 505-537.

SUGINO M.

A histochemical detection of amylophosphorylase and amylo-1,4-1,6-transglucosidase of tissues and cells during the development of animal tooth (résumé Chemical Abstract).
Igaku Kenkyu, 1957, 27 : 2704-2714.

SUMNER J.B., CHOU T.C. et BEVER A.T.

Phosphorylase of the jack-bean; its purification and properties.
Arch. Biochem., 1950, 26 : 1-5.

SUTHERLAND E.W.

Activation of phosphoglucomutase by metal-binding agents.
J. Biol. Chem., 1949, 180 : 1279-1286.

SUTHERLAND E.W. et CORI C.F.

Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1951, 188 : 531-543.

SUTHERLAND E.W.

The effect of epinephrine and the hyperglycemic-glycogenolytic factor on liver and muscle in vitro.
Phosphorus Metabolism, 1952, 2 : 577-593.

SUTHERLAND E.W. et WOSILAIT W.D.

Inactivation and activation of phosphorylase in liver.
Nature, 1955, 175 : 169.

SUTHERLAND E.W. et WOSILAIT W.D.

The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase; preparation and properties.
J. Biol. Chem., 1956, 218 : 459-468.

SUTHERLAND E.W.

Hormonal activation of phosphorylase.
Enzymes : unit of biological structure and fonction (édit. C.H. Gaebler). Academic Press New York, 1956, 536-540.

SUTHERLAND E.W. et RALL T.W.

The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{++}, and epinephrine or glucagon.
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79 : 3608.

SUTHERLAND E.W. et RALL T.W.

Formation of adenosine-3', 5'-phosphate (cyclic adenylate) and its relation to the action of several neurohormones or hormones.
1er Congrès International d'Endocrinologie, Copenhague 1960, 171-174

SWANSON M.A. et CORI C.F.

Studies on the structure of polysaccharides. IV. Relation of the iodine color to the structure.
J. Biol. Chem., 1948, 172 : 825-837.

TAKEUCHI T. et KURIAKI H.

Histochemical demonstration of phosphorylase in animal tissues.
J. Histochem. Cytochem., 1955, 3 : 153-160.

TAKEUCHI T., HIGASHI K. et WATANUKI S.

Distribution of amylophosphorylase in various tissues of human and mammalian organs.
J. Histochem. Cytochem., 1955, 3 : 485-492.

TAKEUCHI T. et KINOSHITA K.

Histochemical demonstration of phosphorylase in blood and bone marrow cells.
Blood, 1956, 11 : 375-379.

TAKEUCHI T., KINOSHITA K. et KOBAYAKAWA S.

Histochemical distribution of phosphorylase in tumor tissues (en japonais)
Tokyo Iji Shinshi, 1956, 73 : 282-284.

TAKEUCHI T.

Histochemistry of polysaccharide synthesis in tissue cells (en japonais ; résumé en anglais).
Symposia for Society of Cell. Chem. Jap. 1957.

TAKEUCHI T.

Histochemical demonstration of branching enzyme (amylo-1,4-1,6-transglucosidase) in animal tissues.
J. Histochem. Cytochem., 1958, 6 : 208-216.

TAKEUCHI T.

Rapport : Enzymes of the biosynthesis of glycogen.
1er Congrès International d'Histochimie et de Cytochimie, Paris 1960.

TAMADA Y.

Histochemical studies of liver of rats during postnatal growth. III. Alkaline and acid phosphatases, glucose-6-phosphatase, and phosphorylase (en japonais ; résumé en anglais).
Arch. Hist. Jap., 1958, 14 : 243-264.

VAUGHAN M., STEINBERG D. et SHAFRIER E.

The effect of epinephrine, glucagon and adrenocorticotrophic hormone on phosphorylase activity in adipose tissues (résumé).
J. Clin. Invest., 1959, 38 : 1051-1052.

VAUGHAN M.

Effect of hormones on phosphorylase activity in adipose tissues.
J. Biol. Chem., 1960, 235 : 3049-3053.

VELICK S.F. et WICKS L.F.

The amino acid composition of phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1951, 190 : 741-751.

VERGA E., HETÉNYI E. et BÓT G.

Adrenaline befolyasa az izomf-oszforiláz aktivitasára ès ennek jelentősege a farádást gatlo hatás mechanizumsában.
Kiserlétes Orvostud., 1959, 11 : 89-96.

VERNE J.

La vie cellulaire hors de l'organisme. La culture des tissus.
Edit. Doin, Paris, 1937, p. 55.

VERNE J.

Histophysiologie du pancreas endocrine des mammifères.
Rapport de la IVe réunion des endocrinologistes de langue française.
Colloque d'endocrinologie, 1957, 281-298.

VERNE J., WEGMANN R. et GUHA S.

Etudes sur l'activité phosphorylasique. III. Effet de la fixation.
Ann. Histochim., 1959, 4 : 251-258.

VERNE J., GUHA S., PETKOV P. et WEGMANN R.

Effet in vivo du glucagon sur le glycogène et sur la phosphorylase hépatique.
Ann. Histochim., 1961, 6 : 135-142.

VERZÁR F. et MCNTIGEL C.

Decrease in glycogen phosphorylation in muscle in vitro after adrenalectomy and restoration with desoxycorticosterone.
Nature, 1942, 149 : 49.

VILAR-PALASI C. et LARNER J.

A uridine coenzyme linked pathway of glycogen synthesis in muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 1958, 30 : 449.

VILAR-PALASI C. et LARNER J.

Levels of activity of the enzymes of the glycogen cycle in rat uterus.
Arch. Biochem. Biophys., 1960, 86 : 270-273.

VINNIKOV J.A.

Functional cyto- and histochemistry of Corti's organ (résumé)
1er Congrès International d'Histochimie et de Cytochimie, Paris, 1960, p. 225.

WAGNER K.

Enzyme studies on white blood cells. I. Glycogen degradation.
Arch. Biochem., 1950, 26 : 123-134.

WATANUKI S.

Histochemical distribution of tissue amylophosphorylase in various animals.
Igaku Kenkyu, 1957, 27 : 1059-1128.

WEGMANN R. et VERNE J.

Etude histochimique des enzymes intervenant dans le métabolisme des polysaccharides.
Ann. Histochim., 1958, 3 : 223-232.

WEGMANN R. et GUHA S.

Etudes sur l'activité phosphorylasique.
II. Effet de la température et du pH.
Ann. Histochim., 1959, 4 : 165-171.

WEGMANN R., VERNE J. et GUHA S.

Activité de l'uridine diphosphoglucose-glycogène transférase dans le muscle.
Ann. Histochim., 1960, 5 : 253-258.

WEGMANN R. et QUENUM A.

Effet de l'alcool sur le comportement histochimique du foie.
Ann. Histochim., 1960, 5 : 165-170.

WILLSTÄTER R. et RHODEWALD M.

Uber den Zustand des Glykogens in der Leber, im Muskel und in Leukozyten.
Z. Physiol. Chem., 1934, 225 : 103-124.

WOSILAIT W.D. et SUTHERLAND E.W.

The reaction of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase.
II. Enzymatic inactivation of liver phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1956, 218 : 469-482.

WOSILAIT W.D.

Studies on the organic phosphate moiety of liver phosphorylase.
J. Biol. Chem., 1958, 233 : 597-600.

WU R.

Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism.
V. Limiting factors of glycolysis in HeLa cells.
J. Biol. Chem., 1959, 234 : 2806-2810.

YASUDA K., FURUSAWA H. et OGATA N.

Histochemical investigation on the phosphorylase in the sweat gland of axilla.
Okijama's Folia Anat., 1958, 31 : 161-169.

YIN H.G. et SUN C.N.

Histochemical method for detection of phosphorylase in plant tissues.
Science, 1947, 105 : 650.

YUNIS A.A., FISCHER E.H. et KREBS E.G.

Crystallization and properties of human muscle phosphorylase a and b.
J. Biol. Chem., 1960, 235 : 3163-3168.

ERRATA

Page 8.	- 1 ère ligne du 2e paragraphe, au lieu de "relèverait" lire "révelerait".
Page 12.	- Légende du Tableau I, au lieu de "Valick" lire "Velick".
Page 24.	- 2e ligne du 1er paragraphe, au lieu de "fransformer" lire"transformer"
Page 35.	- 1ère ligne du 2e paragraphe, au lieu de "restestérone" lire "testestérone".
Page 43.	- 1ère ligne du 2e paragraphe, au lieu de "la guanosine" lire "le guanosine".
Page 50.	- 1ère ligne du 5e paragraphe, au lieu de "Schlisefeld" lire "Schliselfeld".
Page 57.	- 2e ligne du 2e paragraphe, au lieu de "burgeons" lire "bourgeons".
Page 70.	- Dernière ligne du 2e paragraphe, au lieu de "theoritical" lire "thecretical".
Figure 13d.	- Le numéro de la figure doit être considéré comme 13c et non comme 13d.
Figure 13c.	- Le numéro de la figure doit être considéré comme 13d.
Page 107.	- 11e ligne du 3e paragraphe, au lieu de "la phosphorylase est liée" lire "le phosphate est lié".
Page 151.	- Dans GOULD et RAWLISON, aulieu de"RAWLISON" lire " RAWLINSON".
Page 156.	- Dans KIHLMAN et OVERGAARD-HANSEN, au lieu de "OVERGAARD" lire "OVEGAARD".
Page 158.	- Dans LARNER, VILLAR-PALASI et RICHMAN, au lieu de "VILLAR-PALASI" lire "VILAR-PALASI".

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"Histologie de l'appareil digestif des téléostéens"

Vu et approuvé :
PARIS, le 26 Mars 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris
Jean ROCHE